

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**

**"CALIDAD BACTERIOLÓGICA DEL AGUA EMBOTELLADA (BIDON 20L), PRODUCIDA Y COMERCIALIZADA EN EL DISTRITO DE CASTILLA - PIURA".**

**Presentada por:**

**Br. HOLER JESUS CASTILLO RIVERA.**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**BIÓLOGO**

**Línea de investigación:**

**Agroindustria y Seguridad Alimentaria**

**Piura-Perú**

**2018**

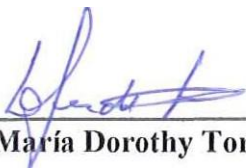
UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

"Calidad bacteriológica del agua embotellada (bidón 20L), producida y comercializada en el distrito de Castilla-Piura"

Línea de investigación:

Agroindustria y Seguridad Alimentaria



---

**Mcblga. María Dorothy Torres de León, M.Sc.**

Presidente



---

**Blgo. Luis Ipanaqué Torres**

Secretario



---

**Blgo. Claudia del Pilar Ruiz González, M.Sc.**

Vocal


## DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS

Yo: HOLER JESÚS CASTILLO RIVERA, identificado con DNI N° 42578767, Bachiller de la Escuela Profesional de CIENCIAS BIOLÓGICAS, de la Facultad de CIENCIAS y domiciliado en AA.HH Túpac Amaru 1 Etapa, Mz 13 Lote 9, del distrito de veintiseis de octubre, Provincia PIURA, Departamento PIURA. Celular: 938178468. E-mail: jesús.castillorivcra@hotmail.com.

DECLARO BAJO JURAMENTO : que la tesis que presento es original e inédita, no siendo copia parcial ni total de una tesis desarrollada, y/o realizada en el Perú o en el extranjero, en caso contrario de resultar falsa la información que brindo, me someto a los alcances de lo establecido en el Art. N° 411, del código penal concordante con el Art. 32° de la Ley N° 27444, y Ley del Procedimiento Administrativo General y las Normas Legales de Protección a los Derechos de Autor.

En fe de lo cual firmo la presente.

Piura, 12 de Junio del 2019

  
\_\_\_\_\_  
HOLER JESUS CASTILLO RIVERA  
DNI N° 42578767

Art. 411.- El que, en un proceso administrativo, hace una falsa declaración en relación con hechos y circunstancias que le corresponden probar, violando la presunción de veracidad establecida por la ley, será reprimido con pena privativa de libertad no menor de uno ni mayor de cuatro años.

Art.4 Inciso 4.12 del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales- RENATI. Resolución del Consejo Directivo N° 033-2016- SUNEDU/CD.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS


TESIS

"Calidad bacteriológica del agua embotellada (bidón 20L), producida y comercializada  
en el distrito de Castilla-Piura"

Línea de investigación:

Agroindustria y Seguridad Alimentaria

Asesor:



---

Mchgo. César Augusto Torres Díaz, M.Sc.


Co-asesor:



---

Mchgo. Jorge Luis Bermejo Benites.

Tesista:



---

Br. Heler Jesús Castillo Rivera.





# UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA FACULTAD DE CIENCIAS



## ACTA DE SUSTENTACIÓN 004-2019-D-FC-UNP

### FACULTAD DE CIENCIAS

Los Miembros del Jurado Calificador que suscriben, reunidos para evaluar la Tesis denominada "CALIDAD BACTERIOLOGICA DEL AGUA EMBOTELLADA (BIDON 20L), PRODUCIDA Y COMERCIALIZADA EN EL DISTRITO DE CASTILLA - PIURA", presentada por el señor Bachiller HOLER JESÚS CASTILLO RIVERA, con el asesoramiento del McBigo. César Augusto Torres Díaz, MSc. y Coasesor McBigo. Jorge Luis Bermejo Benites; oídas las observaciones y respuestas a las preguntas formuladas, y de conformidad al Reglamento de Tesis para obtener el Título Profesional en la Facultad de Ciencias, lo declaran:

APROBADO ( ☒ )

DESAPROBADO ( ☐ )

Con la mención de:

*May Baccus*

☒ En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo de Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el TÍTULO PROFESIONAL DE BIOLOGO.

☒ En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo Universitario de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el TÍTULO PROFESIONAL DE BIOLOGO, después que el sustentante incorpore la sugerencia del Jurado Calificador.

Piura, 17 enero del 2019.

UNP

*[Firma]*  
McBigo. MARIA DOROTHY TORRES GALLO, M.Sc.  
PRESIDENTE DE JURADO DE TESIS

*[Firma]*  
Bigo. LUIS IPANAQUE TORRES  
SECRETARIO DE JURADO DE TESIS

*[Firma]*  
Bigo. CLAUDIA DEL PILAR RUIZ GONZÁLEZ, MSc.  
VOCAL DE JURADO DE TESIS



## DEDICATORIA

*Dedico este trabajo a **DIOS**, todo poderoso por darme la vida, por ser mi fortaleza en los momentos más difíciles y sobre todo por disfrutar de mis seres queridos cada día.*

*A mis padres **José** y **María**, por brindarme su amor desinteresado, y por su dedicación en cada momento. También a mis hermanos **Nelson** y **Johanna**, quienes siempre me alentaron y estuvieron conmigo en los momentos de desolación. A todos ellos **GRACIAS POR TODO**.*

*A mi esposa **Kelly** por su apoyo incondicional y por su comprensión en las situaciones más complicadas de nuestra vida y a mis hijas **Lucero**, **Pamela** y **Andrea**, que son lo mejor que la vida me ha entregado y que me impulsan a dejar lo mejor de mí en cada momento.*

## AGRADECIMIENTO

*Un agradecimiento enorme a la familia CERPER, por su predisposición y apoyo inmediato, sin condición alguna.*

*A Giancarlo Gianggini, quien siempre estuvo presto a orientarme y fortalecer alguna duda en el camino de ésta investigación.*

*Muy en especial a la Señorita Doris Pahuara, jefa del laboratorio sede-Piura, quien me brindó todas las herramientas necesarias para poder ejecutar esta investigación y sobre todo por sus consejos que exaltan su calidad profesional y sobre todo de persona.*

*A mis compañeros de trabajo por estar ahí prestos a escuchar, y comprenderme. Gracias*

*Y por último, pero no menos importante al jurado evaluador que siempre fue muy estricto y correcto en sus críticas constructivas y de mejora.*

# ÍNDICE

DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1.1. Normatividad vigente en el Perú sobre calidad de agua de consumo.....	5
1.1.2. Técnicas de producción de agua de mesa (embotellada).....	7
1.1.3. Grupo de microorganismos indicadores de calidad de agua.....	12
1.1.4. Características de los métodos de ensayo utilizados.....	13
1.1.5. Terminología ISO 11133:2015- productividad, selectividad de medios de cultivo.....	18
1.1.6. Objetivos Generales y Específicos.....	18
II. MATERIAL Y METODOLOGÍA.....	19
2.1. Ubicación del área de estudio:.....	19
2.2. Zona de muestreo:.....	19
2.3. Metodología.....	20
2.3.1. Población:.....	20
2.3.2. Muestra:.....	20
2.3.3. Metodología de uso en la investigación.....	21
2.3.4. Análisis de Muestras.....	22
2.3.5. Métodos de ensayo mediante filtración de membrana.....	24
III. RESULTADOS.....	35
3.1. Recuento de Heterótrofos en placa (RHP).....	36
3.2. Bacterias Coliformes.....	42
3.3. Coliformes Termotolerantes.....	50
3.4. Enumeración de <i>Escherichia coli</i> .....	50
3.5. Detección de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	57
IV. DISCUSIÓN.....	65
V. CONCLUSIONES.....	72
VI. RECOMENDACIONES.....	73

VII. Referencias Bibliográficas.....	74
ANEXOS .....	78
EVIDENCIAS .....	97

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Volumen de muestra recomendados para filtración de membrana .....	15
Tabla 2. Resumen de selección de colonias y los pasos de confirmación.....	17
Tabla 3. Codificación de marcas de agua y registro sanitario .....	21
Tabla 4. Cantidad de muestra, conservación y tiempo de transporte .....	24
Tabla 5. Límites de confianza para Termotolerantes por filtración en 100 ml .....	30
Tabla 6. Tratamiento aplicado a las marcas evaluadas.....	35
Tabla 7. Recuento de Heterótrofos en Placa (RHP) de cada marca de agua en los 04 muestreos.....	37
Tabla 8. Cumplimiento de los valores de Heterótrofos en cada muestreo según- NTS 07141	
Tabla 9. Bacterias Coliformes (UFC/100 ml) en cada marca de agua durante los 04 muestreos.....	43
Tabla 10. Bacterias Coliformes (UFC 250 ml) en cada marca de agua durante los 04 muestreos.....	47
Tabla 11. Coliformes Termotolerantes (UFC/100 ml) de cada marca de agua durante los 04 muestreos.....	51
Tabla 12. Media y desviación estándar del número de coliformes termotolerantes (UFC/100 ml).....	53
Tabla 13. <i>Escherichia coli</i> (UFC/100 ml) en cada marca de agua durante los 04 muestreos. ....	54
Tabla 14. Media y desviación estándar del número de <i>Escherichia coli</i> . ....	56
Tabla 15. <i>P. aeruginosa</i> en 100 ml en cada marca de agua durante los 04 muestreos. ....	58
Tabla 16. Cumplimiento de requisitos microbiológicos de la marca AE2- según NTS 071-2008 .....	60
Tabla 17. Evaluación del proceso de purificación en bases a los requisitos de NTS 071 ...	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema de pre-tratamiento en producción de agua.....	8
Figura 2. Sistema de ósmosis inversa.....	11
Figura. 3 Sistemas de membrana en la ósmosis inversa.....	11
Figura 4: Vista aérea del núcleo urbano-marginal del distrito de Castilla. ....	19
Figura 5. Ubicación de empresas comercializadoras de agua embotellada-distrito de Castilla. .....	20
Figura 6. Toma de muestra para análisis microbiológico.....	23
Figura 7. Siembra de la muestra y preparación de diluciones .....	33
Figura 8. Tratamiento empleado en la producción de agua embotellada. ....	35
Figura 9. Comportamiento del Recuento de Heterótrofos de cada marca en los 4 muestreos. .....	38
Figura 10. Prueba de Anova aplicada a concentración de Heterótrofos de las marcas evaluadas .....	39
Figura 11. Promedio de Recuento de Heterótrofos de cada marca evaluada en los 04 muestreos.....	40
Figura 12. Cumplimiento del requisito de Heterótrofos de cada marca en los 4 muestreos. .....	41
Figura 13. Comportamiento de bacterias Coliformes en cada marca en los 4 muestreos ...	44
Figura 14. Prueba de Anova aplicada a concentración de bacterias coliformes de las marcas evaluadas .....	45
Figura 15. Promedio de Bacterias Coliformes de cada marca durante los 4 muestreos....	46
Figura 16. Comportamiento de bacterias Coliformes (UFC/ 250 ml) en cada marca en los 4 muestreos.....	48
Figura 17. Promedio de Bacterias Coliformes (UFC/250ml) durante los 4 muestreos.....	49
Figura 18. Comportamiento de Coliformes Termotolerantes de cada marca en los 4 muestreos.....	52
Figura 19. Comportamiento de <i>E. coli</i> de cada marca en los 4 muestreos.....	55
Figura 20. Porcentaje de detección de <i>P. aeruginosa</i> en cada marca de agua .....	59
Figura 21. Demostración de muestreos exitosos de la marca AE2 .....	61
Figura 22. Recuento de Heterótrofos en cada etapa del tratamiento .....	63
Figura 23. Bacterias Coliformes en cada etapa del tratamiento .....	63
Figura 24. Detección de <i>P. aeruginosa</i> en cada etapa del tratamiento.....	64

## RESUMEN

La inocuidad del agua de consumo humano, específicamente las aguas embotelladas son de vital importancia para garantizar y salvaguardar la salud pública. En este trabajo se determinó la calidad bacteriológica del agua embotellada que se produce y comercializa en el distrito de Castilla - Piura.

Para ello se seleccionó 10 marcas de agua (bidón de 20 L) y se siguió los métodos establecidos por la NTS 071-2008- Minsa, además se incluyeron los métodos de enumeración de *Escherichia coli* y Coliformes Termotolerantes que forman parte del DS N° 031-2010-DIGESA.

Se utilizó la técnica de membrana filtrante para los ensayos, a excepción del método de Recuento de Heterótrofos en donde se empleó la técnica de incorporación en placa.

Los resultados indicaron que durante los 4 muestreos, ninguna marca evaluada cumplió con los requisitos exigidos en toda su extensión por la NTS 071-2008, en referencia a los límites permisibles para bacterias heterotróficas, bacterias coliformes y *Pseudomonas aeruginosa*

Paralelamente todas las marcas analizadas cumplieron con los límites máximos permisibles para los métodos incluidos del DS N° 031-2010, sin embargo esta normativa no es exclusiva para aguas envasadas.

En consecuencia la calidad bacteriológica del agua embotellada producida y comercializada en el distrito de Castilla- Piura, no cumple con lo que establece la NTS-071-2008 Minsa.

**PALABRAS CLAVE:** calidad bacteriológica, agua embotellada, inocuidad, límite máximo permisible, norma técnica sanitaria, decreto supremo, reglamento de calidad.



## **ABSTRACT**

The innocuousness of water for human consumption, specifically bottled water, is of vital importance to guarantee and safeguard public health. In this work, the bacteriological quality of the bottled water produced and sold in the district of Castilla - Piura was determined.

To do this, 10 watermarks (20 L drum) were selected and the methods established by NTS 071-2008-Minsa were followed, and the enumeration methods of *Escherichia coli* and Thermotolerant Coliforms that are part of DS No. 031 were included. -2010-DIGESA.

The filter membrane technique was used for the tests, with the exception of the Heterotrophic Count method, where the plate incorporation technique was used.

The results indicated that during the 4 samplings, no brand evaluated fulfilled the requirements demanded by NTS 071, in reference to the permissible limits for heterotrophic bacteria, coliform bacteria and *Pseudomonas aeruginosa*.

At the same time, all the brands analyzed complied with the maximum permissible limits for the methods included in DS No. 031, however this regulation is not exclusive for bottled waters.

Consequently, the bacteriological quality of the bottled water produced and marketed in the Castilla-Piura district does not comply with the provisions of the NTS-071-2008 Minsa.

**KEY WORDS:** bacteriological quality, bottled water, safety, maximum permissible limit, sanitary technical standard, supreme decree, quality regulation.

## **I. INTRODUCCIÓN**

El agua en su estado natural no es pura, contiene impurezas de naturaleza orgánica e inorgánica ya sean disueltas, como partículas sedimentables o en suspensión. Las impurezas orgánicas provienen de la biodegradación de compuestos orgánicos que producen ácidos grasos, carbohidratos, aminoácidos e hidrocarburos que liberan sustancias disueltas o en suspensión como material coloidal, y le confieren color al agua. Entre las impurezas inorgánicas podemos mencionar partículas de arcilla, metales pesados y/o tóxicos como hierro, magnesio, plomo, mercurio, etc. Dentro de los contaminantes microbiológicos que puede contener el agua tenemos a virus, bacterias, amebas entre otros (Semino, 2015).

La contaminación del agua es el grado de impurificación, que puede originar efectos adversos a la salud de un número representativo de personas durante periodos previsibles de tiempo. Se considera que el agua está contaminada, cuando ya no pueda utilizarse para el uso que se le iba a dar, en su estado natural o cuando se ven alteradas sus propiedades químicas, físicas, biológicas y/o su composición (Donis, 2008).

El agua es esencial para la vida y todas las personas deben disponer de un suministro satisfactorio; debe realizarse el máximo esfuerzo para lograr que la inocuidad del agua de consumo sea la mayor posible (OMS, 2006).

El problema de la calidad de agua es tan importante como aquello relativo a la escasez de la misma, sin embargo, se le ha brindado menos atención. La calidad del agua se define como el conjunto de características del agua que pueden afectar su adaptabilidad a un uso específico, la relación entre ésta calidad del agua y las necesidades del usuario (OMS, 2006).

La evaluación de la calidad del agua es un proceso de enfoque múltiple que estudia la naturaleza física, química y biológica del agua con relación a la calidad natural. El análisis de cualquier agua revela la presencia de gases, elementos minerales, elementos orgánicos en solución o suspensión y microorganismos patógenos (Mejía, 2005).

Existen diferentes calidades de agua dependiendo del uso que se le dé, como por ejemplo: agrícola, doméstico, industrial, acuicultura, generación de energía, consumo humano, etc. En este estudio nos referiremos siempre al agua para consumo humano, específicamente al agua potable y a su tratamiento (Semino, 2015).

La calidad del agua se establece comprobando las características físicas, químicas y microbiológicas del agua con normas establecidas para tal efecto (Peña, 2017).

El proceso de evaluación de la calidad del agua, es la valoración total de la naturaleza física, química y biológica del agua en relación a la calidad natural, a los efectos humanos y a los usos intencionales (Zhen, 2009).

Las enfermedades causadas por la mala calidad del agua de consumo humano son frecuentes en todo el mundo, ellas ocurren por diferentes causas como la falta de un tratamiento correcto del agua o por contaminación en las redes de distribución. Esto ha creado una desconfianza generalizada sobre la potabilidad del agua de grifo y es la principal razón para que los consumidores prefieran una alternativa de consumo como es el agua envasada en bolsas o en botellas plásticas (Vidal J, Consuegra A, Gomescaseres L, Marrugo J, 2009).

El origen del agua envasada, tal y como lo conocemos hoy, se inicia en la segunda guerra mundial, de la mano de la recuperación económica. A partir de la década de los 60, las aguas minerales pasan de ser adquiridas en farmacias a las estanterías de las tiendas de alimentación, supermercados y grandes superficies.

Por aguas envasadas (embotellada), distintas de las aguas minerales naturales, se entiende que son aguas para consumo humano, que pueden contener minerales que se hallan presentes naturalmente o que se agregan intencionalmente; pueden contener dióxido de carbono por encontrarse naturalmente o se puede agregar, pero no azúcares, edulcorantes, aromatizantes u otras sustancias alimentarias (Codex, 2001).

El término agua potable, aplica al agua fresca natural que ha sido tratada para consumo humano, según estándares de calidad determinados por autoridades nacionales e internacionales. El agua potable es adecuado para todos los usos domésticos habituales, incluido la ingesta, de ahí la denominación de agua de consumo (Donis, 2008).

El agua potable, se define como aquella que cumple con los requisitos fisicoquímicos así como con los biológicos, y que puede ser consumida debido a que no representa un riesgo para la salud (NTP 214.042, 2012). (Anexo IV)

El agua de mesa o embotellada es el agua potable tratada, adicionada o no con gas carbónico, embotellada por procedimientos sanitarios en envases herméticos e inocuos. Según la OMS debe ser agua no contaminada más allá de los límites permitidos por bacterias, parásitos u otros microorganismos patógenos ni por sustancias químicas (Semino, 2015).

El agua embotellada no es necesariamente más sana que el agua potable que proveniente del grifo. La Environmental Protection Agency (EPA, 2 000) estableció los estándares para el agua embotellada provista por los sistemas públicos de tratamiento de agua; la Administración de Alimentos y Drogas (FDA, 2 000) estableció los estándares para agua embotellada basándose en los estándares para agua potable de la EPA. El control puede ser más difícil en el agua embotellada que en el agua de grifo, surgiendo problemas debido al almacenamiento del agua embotellada durante periodos largos, y a temperaturas más altas que las aguas distribuidas por tuberías, o la reutilización de botellas y otros recipientes sin haberlos desinfectado adecuadamente (OMS, 2006).

Todas las aguas embotelladas deben ser seguras para su bebida y por consiguiente, requieren la ausencia de cualquier microorganismo patógeno (causante de enfermedades); pueden recibir tratamiento para eliminar cualquier bacteria dañina y hacerlas seguras para su consumo. Los microorganismos indicadores de la calidad de agua, son muy importantes para controlar la inocuidad de la misma (Senior, 2001).

Si no se toman las precauciones sanitarias adecuadas, el agua embotellada puede contener bacterias, las cuales no se forman probablemente antes del envasado, sino después de haberse envasado, éstas se reproducen a concentraciones que podrían representar un riesgo a la salud. Se ha demostrado que las fuentes de agua pueden contener niveles de hasta  $10^5$  a  $10^7$  ufc/ml (Chaidez, 2002).

Las fuentes de agua embotellada generalmente contienen una microflora muy variada, que incluye las siguientes especies: *Achromobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Flavobacterium* spp., *Alcaligenes* spp., *Acinetobacter* spp., *Cytophaga* spp., *Moraxella* spp., y *Pseudomonas* spp. Estas bacterias se encuentran en pequeñas cantidades, pero pueden multiplicarse rápidamente durante el envasado y almacenamiento del agua. La mayoría de estos organismos no son patogénicos en condiciones normales, pero han sido responsables de infecciones oportunistas en pacientes hospitalizados, siendo los de más alto riesgo aquellos con tratamiento de antibióticos e inmunodeprimidos (Chaidez, 2002).

Por lo tanto; la calidad bacteriológica del agua, se basa en la determinación de aquellos microorganismos que puedan afectar directamente la salud del ser humano o que, por su presencia puedan indicar la posible existencia de otros, tales como coliformes fecales, *Escherichia coli* y *Salmonella* (Zhen, 2009).

El agua embotellada (Bidón), esta categorizada dentro del grupo de Aguas de Bebida, que es uno de los cinco grupos en los que se clasifica la matriz agua, con fines de ensayo para laboratorio (NTP 214.042, 2012).

La elaboración directa de reglamentos y normas relativas al agua de consumo, recaen en las autoridades nacionales de la salud pública que tienen la responsabilidad primaria de establecer normas relativas a la calidad de agua de consumo (OMS, 2006).

## **1.1. MARCO TEÓRICO**

### **1.1.1. Normatividad vigente en el Perú sobre calidad de agua de consumo**

#### **DECRETO SUPREMO N° 031-2010 S.A**

El 28 de julio de 2010, la Asamblea General de las Naciones Unidas reconoció explícitamente el derecho humano al agua y al saneamiento, reafirmando que un agua potable limpia y el saneamiento son esenciales para la realización de todos los derechos humanos.

En este contexto, en el Perú la Dirección general de salud ambiental-DIGESA, asume la tarea de elaborar el “Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo Humano” (DS N° 031-2010 SA. 2011). Derogando así a la Resolución suprema de 1946, el “Reglamento de los requisitos oficiales físicos, químicos y bacteriológicos que deben reunir las aguas de bebida para ser consideradas potables”.

Éste nuevo reglamento, a través de sus 10 títulos, 81 artículos, 12 disposiciones y 5 anexos, no sólo establece límites máximos permisibles, en lo que ha parámetros microbiológicos, parasitológicos, organolépticos, químicos orgánicos e inorgánicos y parámetros radiactivos, se refiere; sino también le asigna nuevas y mayores responsabilidades a los gobiernos regionales, respecto a la vigilancia de la calidad del agua para consumo humano; además de fortalecer a la DIGESA, en el posicionamiento como autoridad sanitaria frente a éstos temas.

El Reglamento de la calidad de Agua para Consumo Humano N°031-2010- DIGESA-2011, establece que toda agua destinada para el consumo humano debe cumplir con los parámetros microbiológicos dentro de los cuales a nivel bacteriológico dictamina los ensayos de: bacterias coliformes totales, *E.coli*, bacterias termotolerantes y bacterias heterotróficas. Además exige determinación de virus. Y dentro de los parámetros parasitológicos se evalúa, huevos y larvas de Helmintos, quistes y ooquistes de protozoarios patógenos. Organismos de vida libre, como algas, copépodos, rotíferos, nematodos en todos sus estadios evolutivos (Anexo II).

Así mismo incluye otros parámetros como calidad organoléptica, parámetros químicos orgánicos e inorgánicos y parámetros radioactivos.

## **DEFINICIONES ADJUNTAS EN EL DECRETO SUPREMO (DS) N° 031**

**Agua tratada.-** Toda agua sometida a procesos físicos, químicos y/o biológicos para convertirla en un producto inocuo para el consumo humano.

**Agua de consumo humano.-** Agua apta para todo uso doméstico habitual, incluida la higiene personal, y la ingesta de la misma.

**Consumidor.-** Persona que hace uso del agua suministrada por el proveedor para su consumo.

**Límite máximo permisible.-** Son los valores máximos admisibles de los parámetros representativos de la calidad del agua

## **RESOLUCIÓN MINISTERIAL N° 591-2008 MINSA**

Para el caso de las aguas envasadas, en el Perú en el año 2003, se estableció la RM N°515, en donde se aprobaron los “Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano” en el cual señalaban los criterios microbiológicos que deben cumplir los alimentos y bebidas en estado natural, elaborados o procesados, para ser considerados aptos para el consumo humano. La cual fue sometida a su vez a la opinión pública interesada, con el objetivo de recibir sugerencias o recomendaciones que pudieran contribuir a su perfeccionamiento.

Es por esto que en el año 2008, con todos los datos recepcionados y discutidos se aprueba la NTS N° 071- MINSA/DIGESA-V.01 “Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano” que forma parte integrante de la Resolución Ministerial N° 591-2008 MINSA, derogando a la RM N° 515, antes mencionada.

El ámbito de aplicación de la actual norma, es de **obligatorio** cumplimiento en todo el territorio nacional, para efecto de todo aspecto relacionado con la vigilancia y control de la calidad sanitaria e inocuidad de los alimentos. Cuya finalidad es garantizar la seguridad sanitaria de los alimentos y bebidas, destinados al consumo humano

Los ensayos microbiológicos establecidos para aguas envasadas carbonatadas y no carbonatadas, según la presente NTS N°071-MINSA son: bacterias heterotróficas, bacterias coliformes y *Pseudomonas aeruginosa*

## **DEFINICIONES BASADAS EN LA NTS N° 071**

**Calidad sanitaria.-** Es el conjunto de requisitos microbiológicos, físico-químicos y organolépticos que debe reunir un alimento para ser considerado apto para el consumo humano.

**Criterio microbiológico.-** Define la aceptabilidad de un producto o un lote de un alimento basado en la ausencia o presencia, o en la cantidad de microorganismos, por unidad de masa, volumen, superficie o lote.

**Inocuidad.-** Garantía de que los alimentos no causaran daño al consumidor cuando se fabriquen, preparen y consuman de acuerdo con el uso al que se destinan

**Lote.-** Conjunto de unidades de un producto del que tiene que tomarse una muestra para determinar la aceptabilidad del mismo.

### **1.1.2. Técnicas de producción de agua de mesa (embotellada)**

#### **Técnicas de clarificación**

La clarificación tiene como objetivo la eliminación de materia orgánica, sólidos suspendidos, los cuales originan turbidez y color al agua. Ésta técnica se aplica en varias etapas primero se aplican coagulante el cual da origen a la floculación, los cuales se sedimentan y decantan para finalmente ser filtrados.

**Filtración.-** Es un proceso que consiste en separar un sólido del líquido en el que está contenido a través de un medio poroso (filtro) que retiene el sólido y por el cual el líquido (filtrado) puede pasar fácilmente. Este proceso presenta ventajas como la separación de la totalidad de los sólidos en suspensión, eliminación de organismos patógenos. Los principales tipos de filtración son:



- a) **Filtración por carbón activado.**- La materia porosa que se utiliza para filtrar es el carbón activado, el cual se activa cuando se calienta a altas temperaturas en ausencia de oxígeno. El carbón activado tiene como característica principal la gran superficie de contacto en relación a su volumen o masa lo que le confiere una fuerte capacidad de adsorción y es excelente en retener moléculas pesadas como compuestos orgánicos aromáticos. El carbón activado también es conocido por su extraordinaria habilidad en eliminar olores y sabores desagradables, además elimina gas radón, sulfuro de hidrógeno, trihalometanos, remueve los compuestos orgánicos volátiles (VOC), los pesticidas, herbicidas y los solventes químicos.



**Figura 1.** Sistema de pre-tratamiento en producción de agua

Fuente: Aquamarket. Soluciones integrales para tratamiento de agua (2016).

Recuperado de: <http://aquamarket.pe/>

- b) **Ultrafiltración.**- La ultrafiltración es una tecnología efectiva para conseguir un agua de calidad libre de bacterias y pirógenos. Al igual que la ósmosis inversa usa una membrana para filtrar los contaminantes del agua pero el tamaño de los poros es mayor que en la ósmosis inversa. El tamaño de los poros de la membrana de ultrafiltración va de 0,001 a 0,02  $\mu\text{m}$ . Para la eliminación de pirógenos, los poros del ultrafiltro deben tener un diámetro menor o igual a 0,002  $\mu\text{m}$  (Semino, 2015).
- c) **Microfiltración.**- Este tipo de filtración utiliza membranas de filtración microspora que no permiten el paso de partículas ni microorganismos (Semino, 2015). Las membranas de microfiltración tienen un tamaño de poro de 0,1-10  $\mu\text{m}$ , suficiente

para retener toda clase de bacterias, turbidez, macromoléculas, coloides, etc. Se utiliza en la esterilización en frío de alimentos líquidos y productos farmacéuticos, reducción de microorganismos del agua, y en el pre-tratamiento del agua (Pastor, 2017).

- d) **Nanofiltración.-** Elimina iones disueltos pero sin alcanzar los niveles de separación de una filtración por ósmosis inversa (Semino, 2015). Mediante la nanofiltración se pueden retener partículas con un tamaño de 0,1 nm-0,001  $\mu\text{m}$ , lo que permite separar del agua la mayoría de moléculas, aunque las de peso molecular bajo queden retenidas en la membrana parcialmente. Ésta técnica se utiliza para el ablandamiento del agua, para la eliminación de metales pesados del agua, y como pre-tratamiento antes de la ósmosis inversa (Pastor, 2017).

### **Técnicas de purificación: Esterilización-desinfección**

La esterilización implica eliminar todas las formas de vida en el agua, es decir que el agua esté exenta de gérmenes vivos. En cambio la desinfección se usa para destruir microorganismos patógenos, sin eliminar necesariamente todos los microorganismos, para esto se puede usar sustancias químicas denominadas desinfectantes.

- a) **Rayos ultravioleta.-** la desinfección ultravioleta usa la luz como fuente cerrada en un estuche protector, de manera que cuando pasa el agua a través del estuche, los rayos UV son emitidos y absorbidos dentro del compartimiento. Las lámparas de luz UV se fabrican con cristal duro de cuarzo, éste permite una transmisión de energía radiada del 90 %. La longitud de onda de 254 nm tiene una potente acción bactericida y la longitud de 185 nm es efectiva en la oxidación de compuestos orgánicos. Los rayos UV son capaces de eliminar a los microorganismos del agua, éstos comprenden una variedad amplia de estructuras únicas como bacterias, virus, hongos, protozoarios y algas. La dosificación mínima universalmente aceptada para que un aparato de rayos ultravioleta sea germicida es de 16000  $\mu\text{w}.\text{seg}/\text{cm}^2$
- b) **Ozonización.-** El ozono es un desinfectante natural eficaz en la oxidación de materias orgánicas e inorgánicas, su poder oxidante y desinfectante es mayor que la del cloro. El ozono es un gas muy inestable, inactiva pesticidas y organismos

patógenos como bacterias y virus. Como principal efecto de la ozonización del agua podemos mencionar:

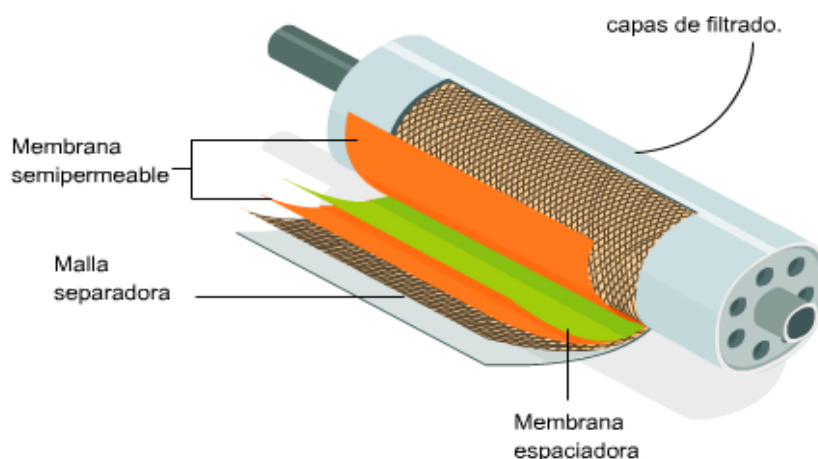
- Desinfección e inactivación.- el ozono destruye o inactiva las enzimas de los microorganismos, las bacterias son más sensibles al ozono como por ejemplo, *Escherichia coli* son destruidas por concentraciones de ozono mayores a 0,1 mg/L y una duración de contacto de al menos 15 segundos a una temperatura entre 25°C a 30°C, los *Streptococcus faecalis*, son destruidos a concentraciones de ozono de 0,025 mg/L aproximadamente, obteniéndose un 99,9% de inactivación en menos de 20 segundos entre 25°C a 30°C. los virus son más resistentes que las bacterias, estudios científicos han demostrado que los polivirus tipo I, II y III quedan inactivos a concentraciones de ozono de 0,4 mg/L por un periodo de contacto de 4 minutos.
  - Eliminación de olores, colores y sabores.- La oxidación de materia orgánica, metales pesados, sulfuros y sustancias extrañas, produce la eliminación de sabores y olores extraños que el agua pudiera contener.
- c) **Ósmosis inversa.**- La ósmosis inversa, es una tecnología que garantiza el tratamiento desalinizador, físico, químico y bacteriológico del agua por eso puede afirmarse que la ósmosis inversa soluciona muchas de las deficiencias de la destilación y el intercambio iónico, ésta técnica funciona mediante membranas, que actúan como filtro, reteniendo y eliminado la mayor parte de las sales disueltas al tiempo que impiden el paso de bacterias y virus, obteniéndose un agua pura y estéril (Semino, 2015).



**Figura 2. Sistema de ósmosis inversa**

Fuente: Aquamarket. Soluciones integrales para tratamiento de agua (2016). Recuperado de: <http://aquamarket.pe/>

La ósmosis inversa es uno de los principales procesos que se realizan dentro de la industria de tratamiento de agua. En ésta, lo que se logra es que el líquido vital recobre su pureza al ser forzada a pasar por una membrana que se encargará de capturar todas las impurezas que en ella se encuentren (Aquamarket, 2015). El pre-tratamiento del agua de abastecimiento influye mucho en la eficacia de éste procedimiento, el propósito del pre-tratamiento es reducir el contenido de materia orgánica y la cantidad de bacterias presentes. Por lo general el pre-tratamiento que requiere el agua, antes de la ósmosis inversa es; ablandamiento, filtración, y desinfección.



**Figura. 3 Sistemas de membrana en la ósmosis inversa**

Fuente: Aquamarket. Soluciones integrales para tratamiento de agua (2016).  
Recuperado de: <http://aquamarket.pe/>

### **1.1.3. Grupo de microorganismos indicadores de calidad de agua**

#### **Bacterias Coliformes**

Miembros de las enterobacterias, son Gram negativas, no formadoras de espora, oxidasa negativa, bacterias en forma de bacilos que son capaces de crecer aeróbica y facultativamente anaeróbica en presencia de sales biliares, y que normalmente son capaces de fermentar lactosa con producción de ácido y aldehído dentro de 48 h, cuando se incuba a temperatura de  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ , se caracterizan por expresar la enzima  $\beta$ -D-galactosidasa en un medio cromogénico (ISO 9308-1, 2014).

#### **Coliformes termotolerantes**

Los coliformes termotolerantes, tradicionalmente llamados coliformes fecales se caracterizan por fermentar la lactosa con producción de gas a  $44.5^\circ\text{C}$ ; han sido documentados en aguas ricas orgánicamente o de climas tropicales en ausencia de contaminación fecal reciente. Una prueba para coliformes termotolerantes puede realizarse utilizando el procedimiento de tubos múltiples o el método de filtro de membrana. (SMEWW-APHA 9221 E, 2017).

#### ***Escherichia coli***

Miembros de las enterobacterias, son Gram negativas, no formadoras de espora, oxidasa negativa, bacterias en forma de bacilos que son capaces de crecer aeróbica y facultativamente anaeróbica, capaces de producir indol a partir de triptófano a  $(21 \pm 3) \text{ h}$  a  $(44,0 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$ , reacciona positivamente en la prueba rojo de metilo y puede descarboxilar ácido L-glutámico, pero no es capaz de producir acetil metil carbinol. Además de expresar las enzimas  $\beta$ -D-galactosidasa y  $\beta$ -D-glucoronidasa en medio cromogénico (ISO 9308-1, 2014).

#### **Bacterias Heterotróficas mesófilas**

Organismos que se alimentan de sustancias orgánicas en grandes o pocas concentraciones, se ha comprobado que el conteo total de éstos, es uno de los indicadores más confiables y sensibles del tratamiento o fracaso de la desinfección. El recuento de Heterótrofos en placa (RHP), detecta una amplia variedad de microorganismos principalmente bacterias que son indicadoras de calidad del agua (Aurazo, 2005).

### ***Pseudomonas aeruginosa***

Son microorganismos que crecen en medios selectivos que contienen ceftriaxona y producen pigmentos como piocianina, pioverdina entre otros, son positivos a la oxidasa, son fluorescentes bajo radiación de luz UV (360 ±20) nm.

Es una bacteria gramnegativa, no forma esporas, son catalasa positiva, exhibe un metabolismo oxidativo como lo indica la prueba de Hugh y Leifson, generalmente reduce el nitrato hacia nitrito y produce amoníaco a partir de la descomposición de la acetamida. La mayoría de las cepas (98%) producen un pigmento fluorescente soluble en agua. La mayoría de las cepas son capaces de crecer a 42 ° C, pero no a 4 ° C, lo que diferencia a *Pseudomonas aeruginosa* de *Pseudomonas fluorescens* que crece a 4 ° C pero no a 42 ° C. La gelatina se licua, la caseína se hidroliza, pero el almidón no se hidroliza. El pigmento piocianina (azul-verde) es producido por más del 90% de las cepas (ISO 16266, 2006).

#### **1.1.4. Características de los métodos de ensayo utilizados**

##### **ENUMERACIÓN DE ESCHERICHIA COLI Y BACTERIAS COLIFORMES**

(ISO 9308-1: Método de filtración por membrana)

La presencia y la propagación de contaminación fecal es un factor importante en la evaluación de la calidad de un cuerpo de agua y el riesgo por infección a la salud humana. El análisis de muestras de agua para la presencia de *Escherichia coli* que normalmente habita en heces humanas y en otros animales de sangre caliente, proporciona un indicador de dicha polución. El examen para bacterias coliformes puede ser más difícil de interpretar ya que algunas bacterias coliformes viven en suelos y en aguas superficiales y no siempre son intestinales. Por lo tanto, la presencia de bacterias coliformes, aunque no prueba una contaminación fecal, puede indicar una falla en el tratamiento, almacenamiento o distribución.

Este método ISO, es en especial adecuado para aguas de baja carga bacteriana, que produzcan menos de 100 colonias sobre un agar coliforme cromogénico (CCA), por lo tanto es recomendable para agua potable, agua de piscina desinfectada o aguas tratadas para potabilización.

Para el ensayo de Enumeración de *Escherichia coli* y bacterias coliformes, se recomienda filtrar 100 ml (u otros volúmenes ej. 250 ml para agua embotellada) de la muestra a estudiar, el volumen mínimo requerido es 10 ml para asegurar una buena distribución de las bacterias sobre el filtro. Se utiliza un filtro de membrana que tengan alrededor de 47 mm o 50 mm de diámetro, con una porosidad nominal de 0.45 µm y de preferencia con cuadrículas.

Para el cálculo de los resultados se puede utilizar en casos en los que el número total de colonias en las placas es de entre 10 y 100 mediante la técnica de filtración por membrana. Dado que se supone que cada colonia que han surgido a partir de un microorganismo o de un solo agregado de microorganismos

### **Aseguramiento de calidad**

Se debe considerar, tener un sistema de control de calidad claramente definido, para asegurar que los materiales, reactivos y técnicas sean apropiadas para el ensayo, y no causa interferencia en el desarrollo del mismo. Es parte de ésta normativa el uso de controles positivos y negativos, así como los blancos.

### **COLIFORMES TERMOTOLERANTES UFC (STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER- SMEWW-9222 D)**

Existen limitaciones para la interpretación de un resultado de coliformes termotolerantes en aguas termales, biofilms en el agua de bebida y muestras de efluentes de las fábricas de celulosa y papel; donde el termotolerante *Klebsiella* ha predominado, y no ha sido indicativo de una fuente de alcantarillado. De acuerdo a la asociación mundial de la salud, *Klebsiella spp*, no representa una fuente de enfermedad gastrointestinal por la ingesta de agua de bebida en la población general. *Klebsiella spp*, son generalmente microorganismos que forman biopelículas y tienen pocas probabilidades de representar un riesgo para la salud.

Utilice volúmenes apropiados para obtener recuentos entre 20 y 60 colonias de coliformes termotolerantes por membrana. Cuando la densidad bacteriana de la muestra es desconocida, filtrar varios volúmenes o diluciones para alcanzar una densidad contable en el rango ya mencionado.

**Tabla 1. Volumen de muestra recomendados para filtración de membrana**

Origen del agua	Volumen (X) a ser filtrada (ml)							
	100	50	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001
Agua potable	X							
Lagos, reservorios	X	X						
Pozos, manantiales	X	X						
Toma de suministro de agua		X	X	X				
Agua de baño naturales		X	X	X				
PTAR			X	X	X			
Ríos				X	X	X		
Escorrentía de aguas pluviales				X	X	X		
Aguas residuales municipales sin tratar					X	X	X	
Desagüe de establos					X	X	X	
Fango de aguas residuales						X	X	X

Fuente: SMEWW-APHA 9222D, 2017

Los resultados mediante la técnica de filtración de membrana, son considerados más precisos que los resultados del número más probable (NMP), aun así los recuentos de membrana pueden subestimar el número de bacterias coliformes viables.

### **Aseguramiento de la calidad**

Es parte de esta norma el uso de controles positivos y negativos, así como mantener control sobre los medios, reactivos y equipos involucrados en el desarrollo, con la finalidad prevenir interferencia.

### **RECuento DE HETEROTROFOS EN PLACA (SMEWW- 9215B)**

El recuento de heterótrofos en placa (RHP) anteriormente conocido como recuento estándar en placa, es un procedimiento para estimar el número de bacterias cultivables vivas heterótrofas en el agua y medir los cambios producidos durante el tratamiento y distribución de las aguas. Las colonias pueden surgir en pares, cadenas, grupos o células únicas, todas las cuales están incluidas en el término “Unidades formadoras de colonias” UFC.



## MÉTODO POR INCORPORACIÓN

El método por incorporación es simple de realizar y puede adaptarse a volúmenes de muestra o muestra diluida que oscila desde 0.1 a 2.0 ml. Las colonias que se producen son relativamente pequeñas y compactas mostrando menos tendencia a rodearse unas a otras que las producidas por crecimiento en superficie. Se debe seleccionar diluciones para que al menos una placa de una serie contenga entre 30 – 300 UFC y cuando se sospeche que existe una alta carga bacteriana se debe preparar diluciones adicionales.

### Aseguramiento estadístico de los resultados

**Control de diluciones consecutivas ( $d^2$ ).**- Es el control de calidad analítico, usado en microbiología, que permite evaluar una muestra ensayada con el método de recuento en placa por la siembra de diluciones consecutivas, a fin de comprobar que los recuentos obtenidos se ajustan a los esperados. El estadístico con el que se evalúa es el de una distribución Chi-cuadrado al 95% de confianza. En el control de diluciones consecutivas ( $d^2$ ), los valores obtenidos serán  $\leq 4$  para ser considerados como aceptados, los valores  $> 4$  serán rechazados, se calcula según fórmula:

$$d^2 = (C_1 - 10C_2)^2 / 10(C_1 + C_2)$$

Donde:

$d^2$ : es el estadístico que se compara con la tabla del Chi cuadrado al 95% de confianza

$C_1$ : es la suma del número de colonias en las placas de menor dilución

$C_2$ : es la suma del número de colonias en las placas de mayor dilución

**Control de duplicados o paralelos ( $D^2$ ).**- Es el control de calidad analítico, el cual permite comprobar que los resultados se encuentran dentro de los criterios establecidos; en microbiología, consiste en evaluar una muestra ensayada con el método de recuento en placa, realizando la siembra de cada dilución por réplica a fin de comprobar que los resultados obtenidos se ajustan a los esperados. El estadístico con el que se evalúa es el de una distribución Chi-cuadrado al 95% de confianza. En el control de duplicados o paralelos de placas ( $D^2$ ), los valores obtenidos serán  $\leq 4$  para ser considerados como aceptados, los valores  $> 4$  serán rechazados, se calcula según fórmula:

$$D^2 = (C_1 - 1C_2)^2 / (C_1 + C_2)$$

Donde:

D<sup>2</sup>: es el estadístico que se compara con la tabla del Chi cuadrado al 95% de confianza

C<sub>1</sub>: es el número de colonias en la placa 1

C<sub>2</sub>: es el número de colonias en la placa 2

## DETECCIÓN Y ENUMERACIÓN DE *Pseudomonas aeruginosa* - MÉTODO POR FILTRACIÓN DE MEMBRANA (ISO 16266:2006)

Esta norma internacional especifica un método para el aislamiento y enumeración de *pseudomonas aeruginosa*, en muestras de agua embotellada mediante la técnica de filtración por membrana. Este método también se puede aplicar a otros tipos de agua con una baja carga bacteriana, por ejemplo, aguas de piscinas y aguas destinadas al consumo humano. Se deben examinar las membranas, luego del periodo de incubación bajo radiación UV. Debe tener en cuenta que los períodos prolongados bajo iluminación UV deben evitarse, debido a que las colonias pueden morir y no crecer en los medios de confirmación.

**Tabla 2. Resumen de selección de colonias y los pasos de confirmación.**

Descripción de colonias en agar CN	Amoniaco a partir de Acetamide	Producción de oxidasa	Fluorescencia en prueba Kings B	Confirmación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Fluorescencia azul- verde	No probar	No probar	No probar	Sí
Fluorescencia NO azul -verde	Reacción (+)	No probar	No probar	Sí
Marrón rojizo	Reacción (+)	Reacción (+)	Reacción (+)	Sí
Otros tipos	No probar	No probar	No probar	No

Fuente: Detección de *Pseudomonas aeruginosa* (ISO 16266:2016)

### Aseguramiento de la calidad

Es parte de esta normativa el uso de un control positivo *Pseudomonas aeruginosa* así como un control negativo *E. coli*, se recomienda para todas las etapas. A pesar que el método propiamente no lo pronuncia, según ISO 8199, se recomienda control de los blancos empleados.

### **1.1.5. Terminología ISO 11133:2015- productividad, selectividad de medios de cultivo**

**Microorganismo de interés (objetivo).**- Microorganismo a ser detectado o enumerado y que expresa características esperadas.

**Microorganismo que no son de interés (no objetivo).**- Microorganismo que es suprimido por el medio y/o bajo condiciones de incubación no muestran la característica esperada del microorganismo objetivo.

**Control positivo.**- En microbiología, es el medio de cultivo o reactivo indicado en el método, al cual se le inocular el microorganismo objetivo.

**Control negativo.**- En microbiología, es el medio de cultivo o reactivo indicado en el método, al cual se le inocular el microorganismo no objetivo.

### **1.1.6. Objetivos Generales y Específicos**

#### **Objetivo General:**

- Determinar la calidad bacteriológica del agua embotellada (Bidón 20L) que se comercializa y produce en el distrito de Castilla - Piura.

#### **Objetivos Específicos:**

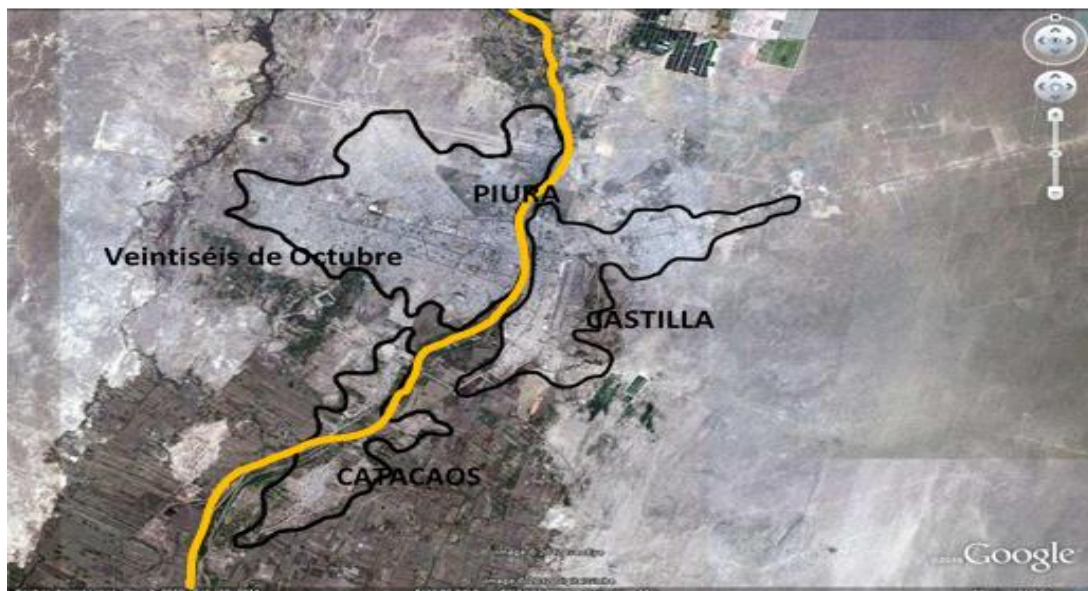
- Definir las condiciones bacteriológicas del agua embotellada basada en la ausencia, presencia, o en la cantidad de unidades formadora de colonia (UFC) por unidad de volumen, según normas sanitarias vigentes.
- Analizar y determinar los posibles factores que favorecen la contaminación del agua embotellada destinada al consumo humano.
- Enumerar bacterias heterotróficas utilizando la técnica de vertido en placa en medio PCA.
- Estimar bacterias coliformes, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando la técnica de membrana filtrante.

## II. MATERIAL Y METODOLOGÍA

### 2.1. Ubicación del área de estudio:

La provincia de Piura se encuentra a 25 m.s.n.m.; sus coordenadas detalladas son 05° 11' 50" latitud Sur, 80° 37' 34" longitud Oeste.

El área determinada para el presente estudio, se ubica en el distrito de Castilla, el cual se sitúa al este del distrito de Piura, entre los 5° 11' 5" de latitud sur, 80° 57' 27" de longitud oeste y a 32 m.s.n.m., comprendiendo las zonas urbanas además de las áreas urbanas - marginales ubicados en el entorno inmediato a las mismas.



**Figura 4: Vista aérea del núcleo urbano-marginal del distrito de Castilla.**

Fuente: Google Earth -2018

### 2.2. Zona de muestreo:

Esta investigación se realizó en el distrito de Castilla específicamente en las urbanizaciones de Miraflores, San Bernardo y Cossío del pomar, así como en los asentamientos humanos de Talarita, caserío Miraflores y finalmente en el cercado de Castilla, abarcando las zonas urbanas y urbano-marginadas, en los meses de **Abril a Octubre 2018**. Se hizo el pedido directamente a las empresas expendedoras de aguas con sus respectivas marcas, la unidad muestral fue cada Bidón de 20 L, y el número de muestras fue 5 (N=5), según el tipo de muestreo basado en la NTS 071 (Ver Anexo I).

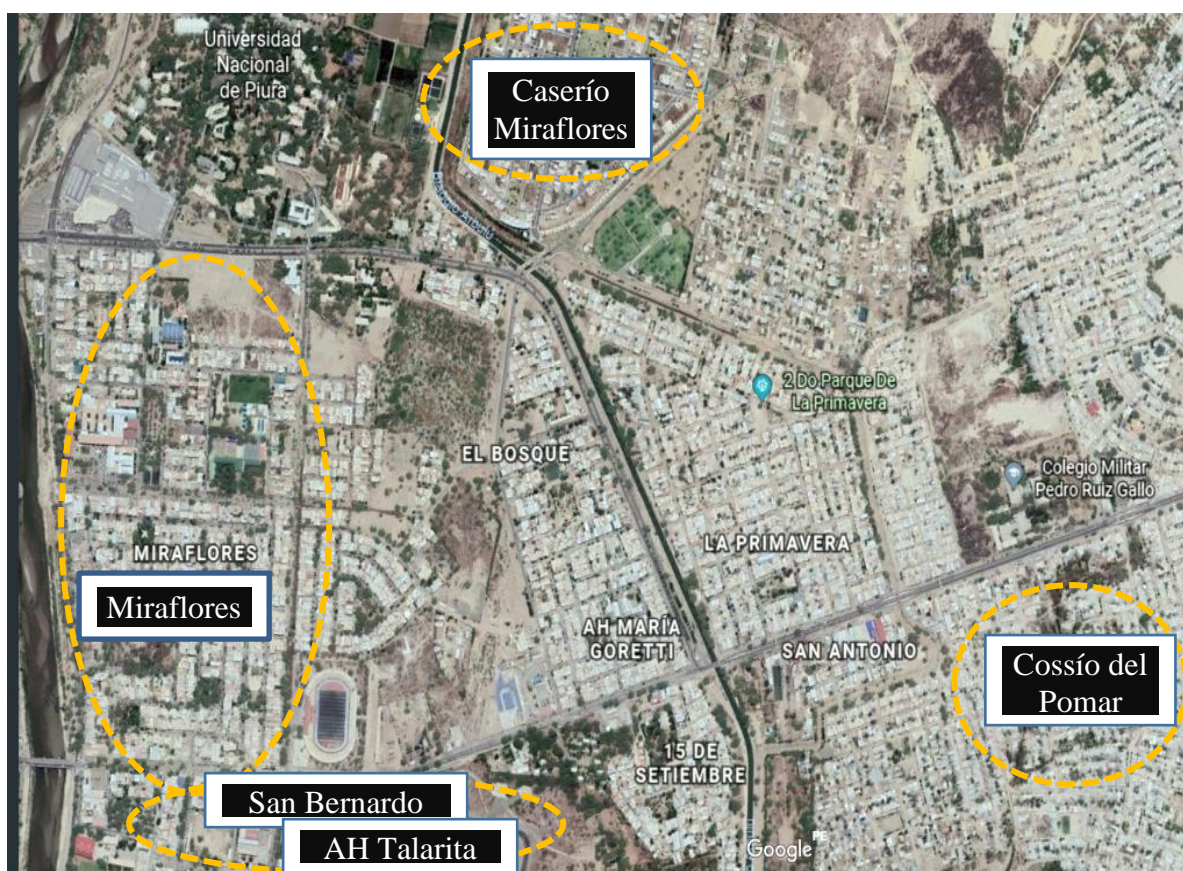
## 2.3. Metodología

### 2.3.1. Población:

Para el presente trabajo de investigación la población fue delimitada por 14 Empresas en el distrito de Castilla dedicadas a la producción y comercialización de agua embotellada, éstas a partir de las 49 marcas que existen en la ciudad de Piura (Anexo III), con la finalidad de analizar la calidad bacteriológica del agua.

### 2.3.2. Muestra:

En cuanto a la muestra, ésta quedó seleccionada en la totalidad de la población, es decir 14 empresas dedicadas a la producción y venta de agua embotellada; de las cuales cuatro ya no se encuentran operativas por cese de actividades o cambio de negocio, por lo tanto la muestra se redujo a 10 marcas y no se requirió el uso de ningún criterio de muestreo estadístico.



**Figura 5. Ubicación de empresas comercializadoras de agua embotellada-distrito de Castilla.**

Fuente: Google Earth 2018.



### 2.3.3. Metodología de uso en la investigación

En consecuencia se estableció el siguiente procedimiento de investigación:

1. La adquisición del agua se hizo por compra directa por vía telefónica (Delivery), a las empresas expendedoras, con un espacio de 3 semanas entre uno y otro, con lo que se obtuvieron 50 muestras por semana 05 bidones por cada marca de agua. Por lo tanto se obtuvieron 200 muestras en total de las marcas elegidas en fechas distintas.
2. Las muestras fueron recolectadas y trasladadas a un ambiente con temperatura controlada (18 – 24 °C) para no alterar las características originales del producto. Cada muestra fue etiquetada con la siguiente información: fecha y hora de toma de muestra, N° de lote y N° de registro sanitario (si lo presentó), luego se trasladaron al laboratorio de CERPER S.A para iniciar los análisis respectivos.
3. Para evitar susceptibilidades se decidió codificar cada marca de agua, durante los 4 muestreos empleando la codificación AE (agua embotellada), se identificó si fuera posible el lote de producción, registro sanitario y condiciones de seguridad del envase. Así mismo se observaría de acuerdo al envase el tipo de tratamiento que recibía cada marca en estudio, por lo que se generó la siguiente tabla:

**Tabla 3. Codificación de marcas de agua y registro sanitario**

<b>Codificación de aguas evaluadas</b>	<b>Condiciones de seguridad de envase</b>	<b>Lote de producción</b>	<b>Registro Sanitario (R.S)</b>	<b>Fecha de producción / vencimiento</b>
AE1	Conforme	No presentó	PO600315N-SAALIV	No presentó
AE2	Conforme	No presentó	PO612914NSAEWEP	No presentó
AE3	Conforme	No presentó	PO605116NSARHEI	No presentó
AE4	Conforme	No presentó	PO611113NSARMSR	No presentó
AE5	Conforme	No presentó	PO607714N/SAIDPQ	No presentó
AE6	Conforme	No presentó	PO608616N/SACISC	No presentó
AE7	Conforme	No presentó	PO601412N SAMNRD	No presentó
AE8	Conforme	No presentó	P-0602214N SANGSR	No presentó
AE9	Conforme	No presentó	PO602015N SAAUDE	No presentó
AE10	Conforme	No presentó	PO604704N/SARMFO	No presentó
Información en base a lo registrado en los envases.				

Fuente: Elaboración propia

### 2.3.4. Análisis de Muestras

#### Análisis Bacteriológicos

Considerando que en la NTS 071-2008. Minsa, para el grupo XVI Bebidas, puntualmente en la sección XVI.3 Aguas envasadas carbonatadas y no carbonatadas, exige evaluar los siguientes agentes microbianos: Bacterias heterotróficas, Coliformes y *Pseudomonas aeruginosa* (Anexo I).

Debido a que la mayor parte de las empresas evaluadas utilizan como fuente principal agua potable, fue necesario trabajar los ensayos que describe el DS N° 031-2010-S.A. Digesa, el cual evalúa: Bacterias coliformes totales (UFC/100mL), *E.coli* (UFC/100mL), Bacterias coliformes termotolerantes (UFC/100mL) y Bacterias heterotróficas UFC/mL (Anexo II). Por lo tanto se consideró razonable conciliar entre los métodos de ensayo exigidos por las 2 normativas del país, determinando así, trabajar con lo requerido por la NTS 071 y agregar los ensayo de *E.coli* y Bacterias coliformes termotolerantes del DS N° 031.

En consecuencia los ensayos y Normas que se realizaron fueron los siguientes:

Para la enumeración de bacterias Coliformes y *E. coli*, se trabajó con la Norma Internacional (ISO 9308-1, 2014), para estimar Coliformes Termotolerantes, se trabajó con la Norma Estándar (SMEWW-9222D; 2017), y para la detección de *Pseudomonas aeruginosa* se empleó la Norma Internacional (ISO 16266, 2006). En éstos análisis se utilizó la técnica de Filtración por Membrana.

Para el recuento de Heterótrofos en placa, se trabajó con la Norma Estándar (SMEWW-9215B, 2017) (Anexo VI), y se realizó mediante la técnica por incorporación.

Los medios de cultivo que se utilizaron para la Técnica de Filtración por Membrana fueron: Agar CN *Pseudomonas* para *Pseudomonas aeruginosa*, Agar Chromocult para bacterias Coliformes Totales, Agar Chromocult y Agar TBX para *E. coli*, Agar mFC medium para Coliformes Termotolerantes. Finalmente se utilizó el medio Agar Plate Count para recuentos de Heterótrofos.

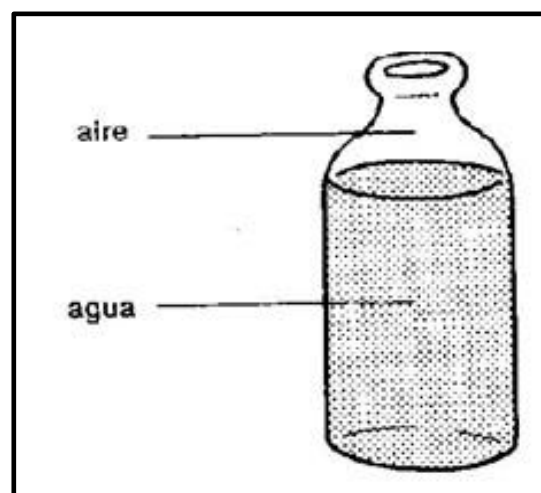
La técnica de filtración por membrana es adecuada para aguas que contienen poco material particulado o materia orgánica en suspensión, por ejemplo agua potable (ISO 8199, 2005).

Esta técnica es altamente reproducible, puede utilizarse para analizar volúmenes relativamente grandes y proporciona resultados numéricos más rápidos que la técnica de fermentación de tubos múltiples (Alfaro & Rojas; 2006).

La técnica por incorporación, es recomendable para volúmenes menores de la muestra, o sus diluciones, y pueden variar entre 0,1 ml y 5 ml, Dependiendo del tamaño de la placa Petri y del volumen de medio de cultivo utilizado. El número total de colonias en la placa debe ser inferior a 300 UFC (SMEWW- 9215 B, 2017).

### **Procedimiento**

Para la toma de muestra se utilizaron frascos plásticos de primer uso esterilizados, con tapas tipo rosca, y con capacidad para 1 litro. Se quitaron los accesorios externos que presentó cada bidón como tapa, sello de seguridad, precintos, y se desinfectó la parte externa de la llave con alcohol de 70° usando algodón hidrófilo. Se dejó correr el agua alrededor de 2 minutos, se consideró tomar 2 o 3 partes de todo el bidón para tener una mejor representación de éste, durante el análisis. Al momento de llenar los frascos de muestra se dejó un volumen libre de por lo menos 2.5 cm de su capacidad para facilitar la homogenización previa al análisis (NTP 214.005, 2016).



**Figura 6. Toma de muestra para análisis microbiológico**

Luego de la toma de muestra, éstas fueron llevadas al laboratorio de Cerper, para iniciar el análisis, no fue necesario medir la temperatura de recepción, ya que según la Directiva



sanitaria (DSa) N° 032-Minsa /Digesa. V. 01, 2010, en el procedimiento para la recepción de muestras de alimentos y bebidas envasadas, debe ser a temperatura ambiente. Como se indica en la siguiente tabla:

**Tabla 4. Cantidad de muestra, conservación y tiempo de transporte**

Tipo de ensayo	Tipo de muestra	Tipo de envase	Cantidad de muestra (a)	Conservación	Tiempo máximo de transporte previo al análisis
Microbiológico	Alimentos y bebidas envasadas	Envase original	200 g o ml	Temperatura ambiente	Hasta su fecha de vencimiento
Observación: (a) Cantidad de muestra mínima correspondiente para cada unidad de muestra.					

Fuente: DSa N° 032-Minsa/Digesa-V. 01- 2010

La selección del volumen de muestra para el análisis, se rigió por la densidad bacteriana esperada y, si es aplicable por los requerimientos regulatorios (U.S.EPA). En éste sentido de acuerdo a la normativa vigente en el país, se definió el volumen de 100 ml, según NTS 071 y DS N° 031, en los cuales indican el volumen mencionado, con la única excepción del ensayo para bacterias coliformes en donde el método recomienda usar para aguas envasadas un volumen de 250 ml, por lo tanto se creyó necesario evaluar también en éste volumen.

### **2.3.5. Métodos de ensayo mediante filtración de membrana**

#### **ENUMERACIÓN DE ESCHERICHIA COLI Y BACTERIAS COLIFORMES (ISO 9308-1: 2014)**

##### **PROCEDIMIENTO**

##### **Preparación de la muestra y selección de tamaño**

Antes de iniciar el análisis, se debió mezclar bien la muestra mediante agitación vigorosa para lograr una distribución uniforme de los microorganismos, evitando así subestimar el valor real que se espera encontrar. Se filtró volúmenes de 250 ml, además de 100 ml de las marcas seleccionadas (ISO 8199, 2005), anexo V.

## **Filtración**

Iniciamos conectando el aparato de filtración estéril a una fuente de vacío. Se colocó el filtro de membrana estéril, con la cuadrícula hacia arriba sobre el disco poroso de la base del filtro, para ello se empleó pinzas estériles de punta plana en la manipulación. Se aseguró firmemente el embudo sobre la base, se vertió sobre éste el volumen conocido de la muestra, utilizando una probeta de clase A para una mejor precisión. Luego se abrió la llave de paso y se encendió el equipo aplicando suficiente vacío (Aproximadamente 70 KPa) para filtrar el agua a través de la membrana, se cerró la llave de paso tan pronto como la muestra fue filtrada y se apagó el equipo. Posteriormente se enjuagó el embudo filtrando tres porciones de 30 ml de diluyente estéril (agua peptinada al 0.1%), mientras el filtro estaba todavía en su sitio. Finalmente, se retiró el embudo asegurándose que la llave esté cerrada antes de hacerlo y se transfirió la membrana con pinzas estériles hacia el agar cromogénico Chromocult, asegurándose que no haya burbujas de aire atrapadas entre la membrana y el medio. Para otro volumen de la misma muestra, el embudo puede reutilizarse sin desinfección siempre que los volúmenes más pequeños y/o la muestra más diluida se hayan filtrado en primer lugar (ISO 8199, 2005).

## **Incubación y diferenciación**

Luego del proceso de filtración se invirtieron las placas colocándolas en pilas no mayores a 6, para asegurar que todas las placas alcancen la temperatura deseada rápidamente. La temperatura y tiempo de incubación fue  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ , durante 21 a 24 horas. Pasado éste periodo se examinaron los filtros de membrana y se contaron todas las colonias que mostraron una reacción  $\beta$ -D-galactosidasa positiva, es decir colonias rosadas a rojas como bacterias coliformes presuntivas que no son *E.coli*. Así también se contaron todas las colonias que mostraron una reacción  $\beta$ -D-galactosidasa y  $\beta$ -D-glucoronidasa (azul oscuro a violeta) como *E.coli*.

En el caso de las bacterias coliformes presuntivas que no son *E.coli*, para evitar resultados falso – positivos, causados por bacterias oxidasa positiva, como por ejemplo *Aeromonas spp*, un ensayo de reacción oxidasa tiene que realizarse; para esto se seleccionaron en la membrana de filtración como mínimo 10 colonias rosadas a rojas, y en aquellas membranas en donde habían menos de 10 se realizó a todas las encontradas. Fue necesario subcultivar en un agar no selectivo, agar Tripticasa con Soya (TSA) y se incubó a  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$  por  $(21 \pm 3)$  h, para asegurar que el ensayo de oxidasa se haya realizado a partir de cultivos puros. El ensayo de oxidasa se realizó añadiendo dos o tres gotas del reactivo de oxidasa fresca en

un papel de filtro sobre una placa Petri, en donde parte de la colonia del agar TSA se transfirió sobre el papel filtro, opcionalmente se agregó las gotas del reactivo directamente sobre las placas de TSA. Una reacción oxidasa positiva se muestra por la apariencia de un color azul oscuro dentro de los 30 segundos; esto no se observó para bacterias coliformes ya que son oxidasa negativa (ISO 9308-1, 2014).

Como aseguramiento de calidad se emplearon controles positivos, utilizando las cepas patrón *Escherichia coli* – ATCC 25922 y *Enterobacter aerogenes* – ATCC 13048, así como el uso de un control negativo empleando la cepa patrón *Pseudomonas aeruginosa* – ATCC 10145. Además se comprobó la esterilidad de los medios de cultivo y materiales empleados mediante un control blanco, el cual incluyó el filtrado de 100 ml de agua peptonada al 0.1% empleando una membrana y embudo de filtración estériles, finalmente se colocó sobre el agar cromogénico y se incubó con las mismas condiciones de la muestra. Esto para demostrar que no existió interferencia en el desarrollo del método.

### **Expresión de los resultados**

A partir de los conteos de colonias características en la membrana, se calculó el número de *E.coli* y bacterias coliformes en 100 ml y/o 250 ml de la muestra. Para el conteo de bacterias coliformes, se determinó por la suma de todas las colonias rosadas a rojas de oxidasa negativa más todas las colonias azul oscuro a violeta. En el caso de encontrarse colonias azul oscuro a violeta, fueron todas contadas como *E.coli*

Para el cálculo de los resultados y con el criterio de que cada colonia observada en la membrana surgió a partir de un microorganismo o de un sólo agregado de microorganismos.

El resultado se expresó con la siguiente fórmula general (ISO 8199, 2005):

$$Cs = \frac{Z}{V_{tot}} \times Vs$$

Donde:

**Cs:** número de UFC en el volumen de referencia Vs de la muestra

**Z:** suma de colonias contadas en la membrana derivada de las diluciones o volúmenes de muestra

**Vs:** volumen elegido para la expresión de la concentración de microorganismos

**Vtot:** volumen total de la muestra original

Selección para la confirmación (al menos 10 colonias), calcular según fórmula (ISO8199, 2005):

$$x = \frac{k}{n} \times z$$

Donde:

**x**: número estimado de colonias confirmadas por placa

**k** : número de colonias que cumplen con el criterio de confirmación

**n**: número de colonias presuntivas inoculadas para confirmación

**z**: número total de colonias presuntivas contadas en placa

Para el cálculo después de confirmación, reemplazar “x” en “Z” de la formula general

### **Intervalos de confianza al 95%**

**Cuando  $Z \geq 20$**

$$Cs \pm 95 \% CI = \frac{Z \pm 2\sqrt{Z}}{V_{tot}} \times Vs$$

**Cuando  $Z < 20$**

$$Cs \pm 95 \% CI = \frac{Z + 2 \pm 2\sqrt{Z+1}}{V_{tot}} \times Vs$$

### **Estimación de conteos bajos (B: Estimado)**

Si la membrana contenía entre 9 - 4 colonias, se calculó el resultado como el caso general y se reportó como número estimado (B).

Si había entre 3-1 colonias se reportó como Organismo presente en / volumen estudiado.

Si no hubo colonias en ninguna membrana se expresó el resultado como: <1/vol. Total ufc (para enumeración); “cero” 0 para detección.

### **COLIFORMES TERMOTOLERANTES UFC (SMEWW-APHA-AWWA-WEF-9222 D)**

#### **PROCEDIMIENTO**

##### **Selección del tamaño de muestra**

Se seleccionó el volumen de la muestra de agua a evaluar de acuerdo a la información en la tabla 01, además del volumen establecido según el DS N° 031, que se expresa en 100 ml.

### **Filtración de la muestra**

Utilizando pinzas estériles, se colocó un filtro de membrana estéril (con la cuadrícula hacia arriba) sobre la placa porosa de la base. Luego se colocó con cuidado el embudo adaptando la unidad sobre la base y se fijó en su lugar; se vertió sobre éste el volumen de estudio utilizando una probeta de clase A para una mejor precisión. Se filtró la muestra encendiendo el equipo y abriendo la llave de paso, ejerciendo una presión diferencial de (34 a 51 Kpa) sobre el filtro de membrana. Con el filtro todavía en su lugar, se enjuagó el interior del embudo mediante la filtración de 3 porciones de 30 ml de agua de dilución tamponada estéril (agua peptonada 0,1%). Al término del enjuague final y del proceso de filtración, se cerró la llave de paso, se retiró el embudo e inmediatamente se transfirió el filtro de membrana con pinzas estériles sobre el medio mFC, realizando un movimiento de rotación para evitar el atrapamiento de aire entre el medio y la membrana.

### **Incubación**

Las placas fueron colocadas en bolsas de plástico impermeables se sellaron, invirtieron y sumergieron en un baño de agua, incubándolas por  $24 \pm 2$  h a  $(44.5 \pm 0.2) ^\circ\text{C}$ , asegurándose que estén debajo de la superficie del agua para mantener los requerimientos críticos de temperatura. Se colocaron todos los cultivos preparados en el baño de agua dentro de los 30 minutos después de la filtración.

### **Recuento**

Luego del periodo de incubación se observaron las placas a baja potencia (10 a 15 aumentos) utilizando un contador de colonias. Las colonias producidas por bacterias coliformes termotolerantes en el medio m FC, son de distintos tonos de azul, esto en base al uso de un control positivo con la cepa patrón *Escherichia coli* – NCTC 9001 y como control negativo se empleó la cepa patrón *Enterobacter aerogenes* – ATCC 13048. Además del uso de controles blanco, como el control de unidad de filtración (embudo estéril) en el cual se filtró 100 ml del diluyente agua peptonada al 0.1% y se transfirió la membrana sobre el agar, también se empleó un control de membrana, la cual de manera aséptica se colocó directamente sobre el agar m FC y finalmente un control de esterilidad del medio de cultivo (CEM) el cual se incubó sin membrana. Todos estos blancos se incubaron bajo las mismas condiciones que las muestras para demostrar que no existió interferencia del método.

## Verificación

Se verificó colonias azules típicas y cualquier colonia atípica de gris a verde, se eligió al menos 05 colonias típicas y atípicas de una muestra positiva y si hubieran menos se tomaron todas, utilizando caldo lauril triptosa y caldo EC, ajustando los conteos basados en el porcentaje de verificación, para determinar falsos negativos, elegir colonias atípicas representadas de diferentes tipos morfológicos y también verificarlos.

## CALCULO DE LA DENSIDAD

Para el recuento de colonias se aplicó la siguiente ecuación general

$$\text{Colif. Termotolerantes/ 100 ml} = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias contadas}}{\text{muestra filtrada (ml)}} \times 100$$

Para los recuentos de Coliformes termotolerantes verificados, se ajustó el recuento inicial basado en el porcentaje de verificación de positivos y reportó como sigue:

$$(\%) \text{ Colif. Termotolerantes verificados/ 100 ml} = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias verificadas}}{N^{\circ} \text{ total de colonias a verificar}} \times 100$$

Para muestras de agua, en donde no se observaron colonias, se reportó el recuento de colonias como “< 1 UFC/100 ml”.

## CONFIABILIDAD ESTADISTICA

La tabla 9222: III ilustra los límites de confianza al 95%; estos valores están basados en la suposición de que las bacterias están distribuidas al azar y siguen una distribución de Poisson. Para resultados con recuentos (c) mayores a 20 colonias, se calcularon los límites de confianza al 95% aproximadamente usando las siguientes ecuaciones de distribución normales:

$$\text{Límite Superior} = c + 2\sqrt{c}$$

$$\text{Límite Inferior} = c - 2\sqrt{c}$$

**Tabla 5. Límites de confianza para Termotolerantes por filtración en 100 ml**

Numero de colonias de Coliformes contadas	Límites de confianza del 95%	
	Inferior	Superior
0	0.0	3.7
1	0.1	5.6
2	0.2	7.2
3	0.6	8.8
4	1.0	10.2
5	1.6	11.7
6	2.2	13.1
7	2.8	14.4
8	3.4	15.8
9	4.0	17.1
10	4.7	18.4
11	5.4	19.7
12	6.2	21.0
13	6.9	22.3
14	7.7	23.5
15	8.4	24.8
16	9.2	26.0
17	9.9	27.2
18	10.7	28.4
19	11.5	29.6
20	12.2	30.8

Fuente: SMEWW-APHA 9222 D, 2017- Tabla 9222: III

## **DETECCION Y ENUMERACION DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA (ISO 16266:2006)**

### **PROCEDIMIENTO**

#### **Preparación de la muestra y selección del tamaño**

Previo al análisis, se mezcló bien la muestra realizando agitación vigorosa para lograr una distribución uniforme de los microorganismos, para evitar subestimar el valor real que se espera encontrar (ISO 8199, 2005). Se filtró en volumen de 100 ml de las marcas seleccionadas, de acuerdo al requerimiento de la NTS 071.

## **Filtración**

Se conectó el aparato de filtración estéril a una fuente de vacío. Se colocó el filtro de membrana estéril, con la cuadrícula hacia arriba sobre el disco poroso de la base del filtro, para ello se empleó pinzas estériles de punta plana en la manipulación. Se aseguró firmemente el embudo sobre la base, se vertió sobre éste el volumen conocido de la muestra, utilizando una probeta de clase A para una mejor precisión. Luego se abrió la llave de paso y se encendió el equipo aplicando suficiente vacío (Aprox. 70 KPa) para filtrar el agua a través de la membrana, se cerró la llave de paso tan pronto como la muestra haya sido filtrada y se apagó el equipo. Posteriormente se enjuagó el embudo filtrando tres porciones de 30 ml de agua peptonada al 0.1 %, mientras el filtro estaba todavía en su sitio. Finalmente, se retiró el embudo asegurándose que la llave esté cerrada antes de hacerlo y transfirió la membrana con pinzas estériles hacia el agar CN, asegurándose que no haya burbujas de aire atrapadas entre la membrana y el medio. (ISO 8199, 2005).

Como aseguramiento de calidad se usó un control positivo, empleando la cepa patrón *Pseudomonas aeruginosa* – ATCC 10145 y como control negativo la cepa patrón *Escherichia coli* – ATCC 25922. Además se comprobó la esterilidad de los medios de cultivo y materiales empleados mediante un control blanco, en el que se filtró 100 ml de agua peptonada al 0.1% empleando una membrana y embudo estériles, finalmente se colocó sobre el agar cromogénico y se incubó bajo las mismas condiciones que las muestras.

## **Incubación y evaluación**

Luego de la filtración se invirtieron las placas colocándolas en pilas no mayores a 6, para asegurar que todas las placas alcancen la temperatura deseada rápidamente. La temperatura y tiempo de incubación fue  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ , por  $(22 \pm 2)$  y  $(44 \pm 4)$  horas. Pasado éste periodo se examinaron los filtros de membrana bajo radiación ultravioleta con ayuda de una lámpara de emisión de luz UV de onda larga de 365 nm; se tomó las precauciones necesarias como uso de guantes y lentes con filtro. Se examinaron todas las membranas que expresaban pigmentos como piocianina (azul-verdoso) y pioverdina (amarillo-verdoso) con emisiones fluorescentes confirmando presencia de *Pseudomonas aeruginosa*, todas las membranas que presentaron colonias que no producían piocianina o pioverdina y que presentan vestigios de fluorescencia, u colonias de color marrón rojizo que no emiten fluorescencia se determinaron como presuntas *pseudomonas aeruginosa*., y se sometieron a pruebas de confirmación.



## **Confirmación**

Solo en el caso de obtener colonias que no presentaban reacción fluorescente bajo la lámpara de lectura, es decir colonias amarillo-marrones se confirmaron en:

La prueba de oxidasa, se realizó de la misma manera que el método (ISO-9308-1) ya descrito, además de esta prueba se confirmó en caldo acetamida, para esto se inoculó un tubo por cada colonia subcultivada en el agar nutritivo y se incubó a  $(36 \pm 2)^\circ \text{C}$  durante  $(22 \pm 2)$  horas. Después de éste periodo se agregó 2 gotas de reactivo de Nessler y se evaluaron los tubos emitiendo fluorescencia, además de la confirmación de producción de amoníaco, que se caracteriza por la aparición de un color que varía de amarillo a rojo ladrillo según la concentración.

En el caso específico de tener reacciones positivas de oxidasa para colonias marrón-rojizas no fluorescentes, éstas se confirmarían en medio Kings B, lo cual no ocurrió.

## **Expresión de los resultados**

Para las muestras de agua embotellada en estudio, los resultados se expresaron en función a la detección más no como enumeración, lo cual hubiese significado seguir lo establecido en la ISO 8199, como en los métodos anteriores ya descritos. Por lo tanto para éste método de ensayo en particular se expresaron los resultados como Ausencia o Presencia / volumen evaluado.

## **MÉTODO DE ENSAYO POR TÉCNICA DE INCORPORACIÓN**

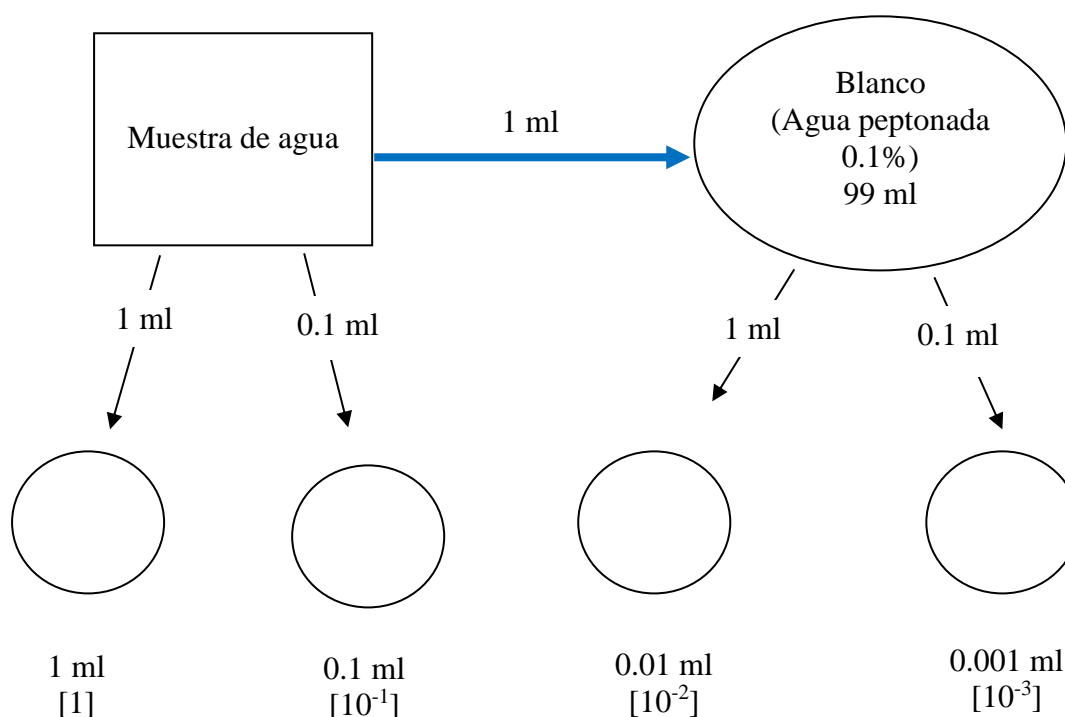
### **Recuento de Heterótrofos en Placa (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater-SMEWW 9215B)**

#### **PROCEDIMIENTO**

##### **Preparación de la muestra**

Antes de proceder con el análisis se marcó cada placa Petri con el código de la muestra y dilución usada. Se preparó réplicas de dos placas por cada dilución, trabajando hasta la dilución  $10^{-3}$ , sembrando 1 ml y 0.1 ml de la muestra sin diluir, 1 ml y 0.1 ml de la muestra diluida, es decir la dilución  $10^{-2}$ . **(Ver figura 7)**

Se mezcló cuidadosamente todas las muestras o diluciones, haciendo 25 movimientos rápidos completos de arriba hacia abajo para obtener una buena homogenización y evitar agrupamiento de bacterias. Se utilizó una pipeta estéril desechable de 1 ml para cada dilución, se tuvo en cuenta que al extraer la muestra, no se inserte la pipeta más de 2 ó 3 cm por debajo de la superficie de la muestra o dilución. Al descargar las porciones de muestra se consideró formar un ángulo de 45° con la punta de la pipeta y tocando el fondo de la placa o el interior del cuello de la botella de dilución. Se dejó drenar de 2 a 4 segundos la muestra de 1 ml contenida dentro de la pipeta, evitando así generar burbujas o salpicaduras en los bordes de las placas. Para diluir la muestra se agregó 1 ml de ésta, a 99 ml de agua peptonada esterilizada al 0.1 %, para obtener la proporción 1:100 ( $10^{-2}$ ), por gravimetría se obtuvo el volumen del diluyente, es decir se pesó 99 g de agua peptonada en un frasco estéril de 250 ml.



**Figura 7. Siembra de la muestra y preparación de diluciones**

Fuente: SMEWW-9215 B, 2017

### **Vertido en placas**

Se licuó el medio de agar estéril, Plate Count (PC), en agua hirviendo dentro de un envase hermético y se mantuvo temperado en un baño de agua controlado entre 44 y 46 °C, hasta

su uso que no debió exceder las 3 horas; se incorporó el medio a las placas ya inoculadas de modo que no haya transcurrido más de 10 minutos entre la dilución de la primera muestra hasta la última placa de la serie. Antes de verter el medio se asperjó alcohol de 70 % al envase, se limpió con papel toalla y se flameo antes de servir. Se vertió al menos 10 a 12 ml en cada placa levantando cuidadosamente la tapa para el plaqueo, a medida que cada placa era vertida se rotaba con cuidado en una dirección y luego en la dirección opuesta. Finalmente se dejó solidificar las placas sobre una superficie plana al menos 10 minutos, luego se invirtieron las placas formando pilas de 4, se colocó fecha y hora que se incubaron.

### **Controles de esterilidad**

Se comprobó la esterilidad del medio y de los blancos de agua de dilución empleados mediante el vertido en placas control por cada serie de muestras, es por esto que se realizó control del agar, control del ambiente, el cual se expuso la placa con agar solidificado por 15 minutos y control de esterilidad del diluyente usado (CED), para esto se filtró 100 ml de agua peptonada estéril al 0.1% ,se colocó la membrana en el agar PC y se incubó a 35° por 48h.

### **Incubación y cálculo de la densidad**

Para la incubación de las placas por el método por incorporación se trabajó a una temperatura de  $35 \pm 0.5$  °C por 48 horas. Pasado éste periodo se realizó el conteo de todas las colonias en las placas seleccionadas, empleando un contador de colonias de campo oscuro y que tenía incorporado un sensor táctil para un mejor control en el conteo. Sí en la primera dilución tomada el número de colonias superaba las 300 colonias, se tomó la siguiente dilución en donde se obtuvieran recuentos entre 30 – 300 colonias, incluida su réplica.

Se calculó el recuento por mililitro según la siguiente ecuación:

$$\text{UFC/ml} = \frac{\text{Recuento de colonias}}{\text{Volumen de muestra plaqueada(ml)}}$$

Como se realizó replicas por cada dilución, se sacó el promedio de los recuentos de las diluciones seleccionadas para calcular el resultado, finalmente se reportó expresando el resultado con dos cifras significativas sólo cuando se convirtieron en “UFC”. Paralelamente se calcularon los controles de duplicados (D2) y de diluciones consecutivas (d2), como un control estadístico de nuestros resultados, asegurando así la validez de los mismos.

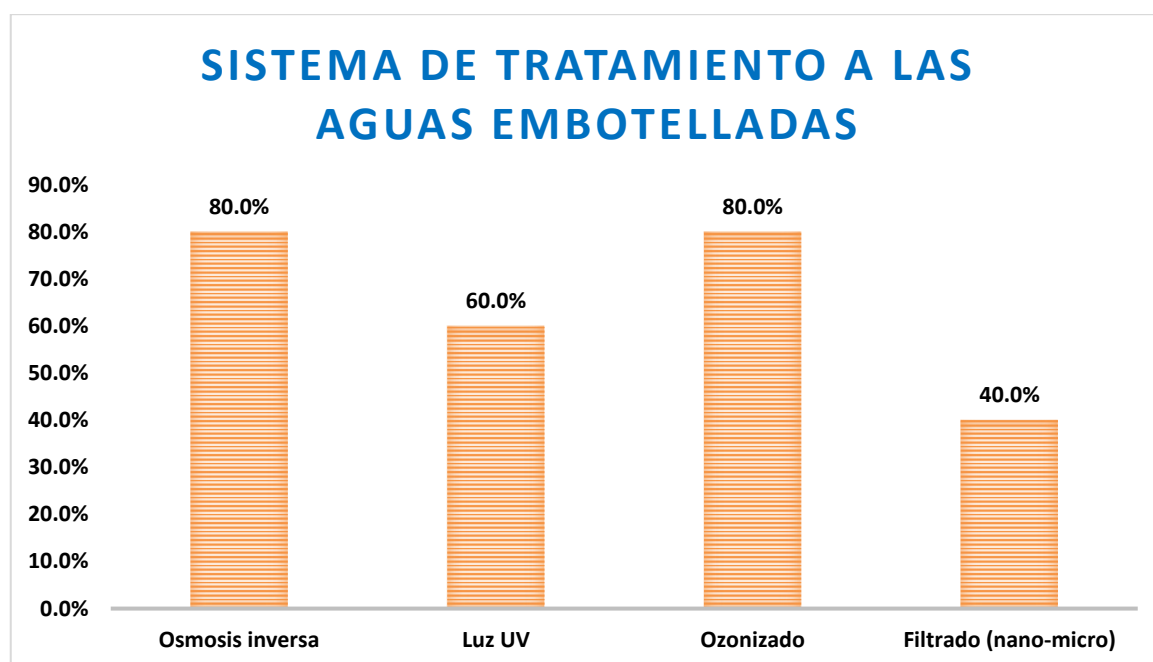
### III. RESULTADOS

De acuerdo a la **tabla 6 y figura 8**, el sistema ósmosis inversa es utilizado por 8 de las 10 empresas y representan el 80% del total, luz UV es utilizada por 6 empresas y representan el 60%, el ozonizado es utilizado por 8 empresas y representan el 80%, mientras que el filtrado es empleado solo por 4 empresas y representan el 40% del total de ellas.

**Tabla 6. Tratamiento aplicado a las marcas evaluadas**

Marca evaluada	Tipo de tratamiento				
	Ósmosis inversa	Radiación de luz UV	Ozonización	Nanofiltrado	Microfiltrado
AE1	✓	✓	-	-	-
AE2	✓	✓	✓	✓	
AE3 (*)	-	-	-	-	-
AE4	✓	-	✓	-	-
AE5	✓	✓	✓	-	-
AE6	✓		✓	-	-
AE7	-	✓	✓	-	✓
AE8	✓	-	✓	-	✓
AE9	✓	✓	✓	-	✓
AE10	✓	✓	✓	-	-
(*) Durante los 4 muestreos no declaró el tipo de tratamiento realizado					

Fuente: Elaboración propia



**Figura 8. Tratamiento empleado en la producción de agua embotellada.**

### **3.1. Recuento de Heterótrofos en placa (RHP)**

**En la tabla 7**, se muestran los resultados obtenidos de cada marca de agua durante los 4 muestreos, en donde según la NTS 071-2008, de las 5 unidades muestreadas ( $n=5$ ) por lo menos 2 ( $n=2$ ), deben estar en un rango entre 10 – 100 UFC/ml, para poder cumplir con éste requisito.

Así mismo se muestra el comportamiento de los valores de heterótrofos de cada marca durante la investigación, se aprecia que la tendencia de los recuentos encontrados está exageradamente por encima de lo que establece la norma sanitaria (**Figura 9**).

**En la tabla 8 y figura 12**, se observa el cumplimiento de los valores de heterótrofos en cada muestreo de acuerdo a la norma sanitaria, se puede corroborar que ninguna marca cumple con éste requisito al 100%, es decir en los 4 muestreos.

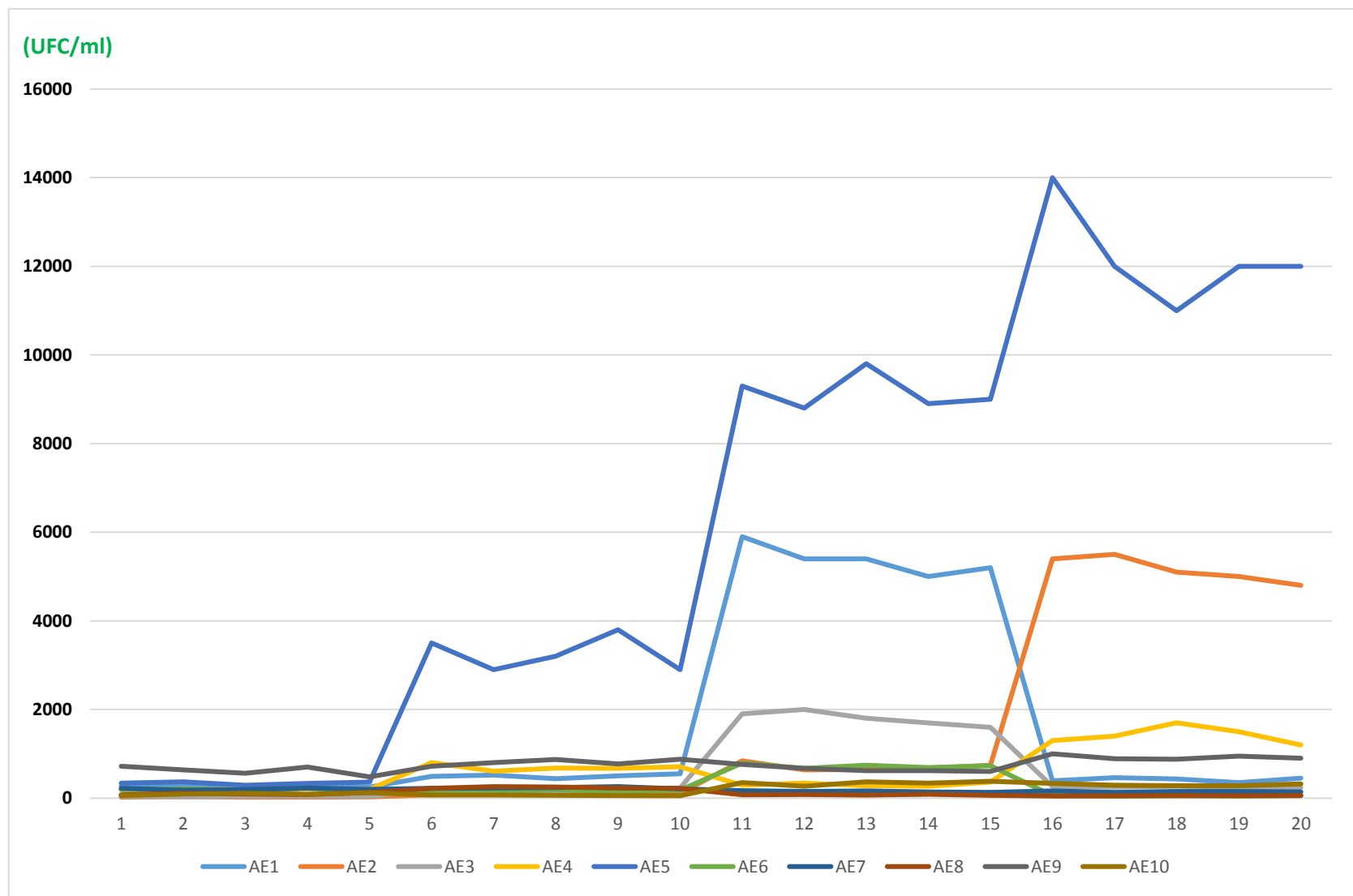
Se observa que las marcas AE1, AE4, AE5, AE7 y AE9 no cumplieron con los límites establecidos en la norma sanitaria en ningún muestreo, mientras que la marca AE3 y AE6 cumplieron en 1 de los 4 muestreos (25%), las marcas AE2 y AE10 cumplieron en 2 de los 4 muestreos (50%). Finalmente la marca AE8, cumplió en 3 de los 4 muestreos (75%).

**Tabla 7. Recuento de Heterótrofos en Placa (RHP) de cada marca de agua en los 04 muestreos.**

Método	Marca	Muestreo 1 (18-19/06/2018)					Muestreo 2 (25-26/07/2018)					Muestreo 3 (21-22/08/2018)					Muestreo 4 (17-18/09/2018)				
		N1	N2	N3	N4	N5	N1	N2	N3	N4	N5	N1	N2	N3	N4	N5	N1	N2	N3	N4	N5
<b>RHP (UFC/ml)</b>	AE1	270	260	260	250	250	490	520	440	500	550	5900	5400	5400	5000	5200	390	460	430	350	450
	AE2	25	34	22	23	28	74	86	120	79	110	840	640	650	670	740	5400	5500	5100	5000	4800
	AE3	39	30	38	37	42	180	190	160	210	230	1900	2000	1800	1700	1600	260	250	270	250	240
	AE4	200	190	200	210	200	800	610	680	670	710	290	340	280	270	360	1300	1400	1700	1500	1200
	AE5	340	370	290	330	360	3500	2900	3200	3800	2900	9300	8800	9800	8900	9000	14000	12000	11000	12000	12000
	AE6	190	210	180	220	170	150	160	190	150	180	790	670	740	690	730	59	43	53	51	57
	AE7	220	180	190	230	200	220	230	240	260	210	170	150	160	140	130	160	130	150	150	140
	AE8	75	110	95	80	130	220	260	250	230	220	73	80	70	84	63	47	49	55	50	55
	AE9	720	640	560	700	480	720	800	870	770	880	760	670	620	620	600	1000	890	880	950	900
	AE 10	58	90	110	85	120	69	72	66	58	54	350	270	370	340	380	330	290	280	280	320

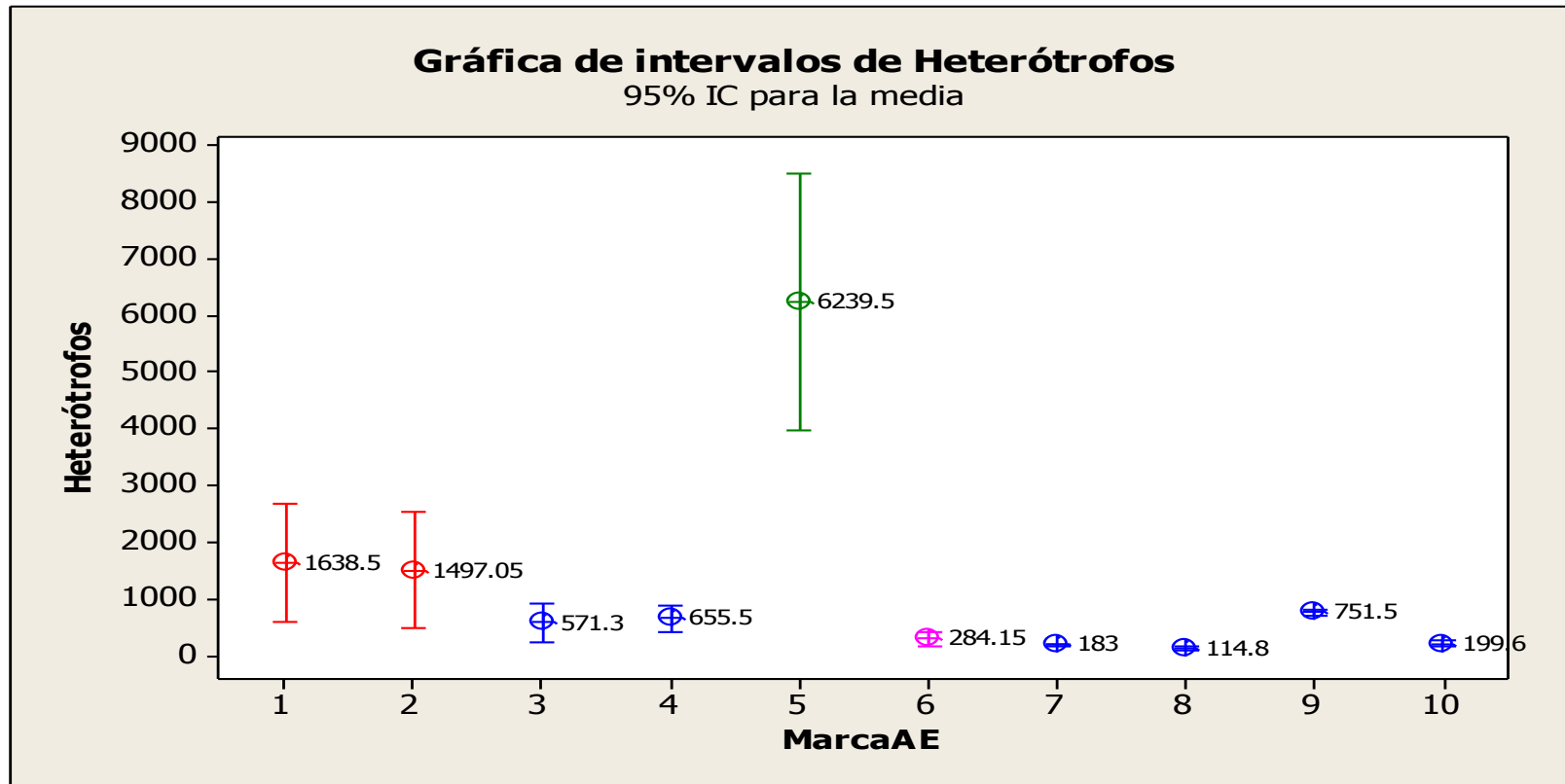
Fuente: Elaboración propia

Obtención de valores (**ver anexo X**)



**Figura 9. Comportamiento del Recuento de Heterótrofos de cada marca en los 4 muestreos.**

## HETEROTROFOS

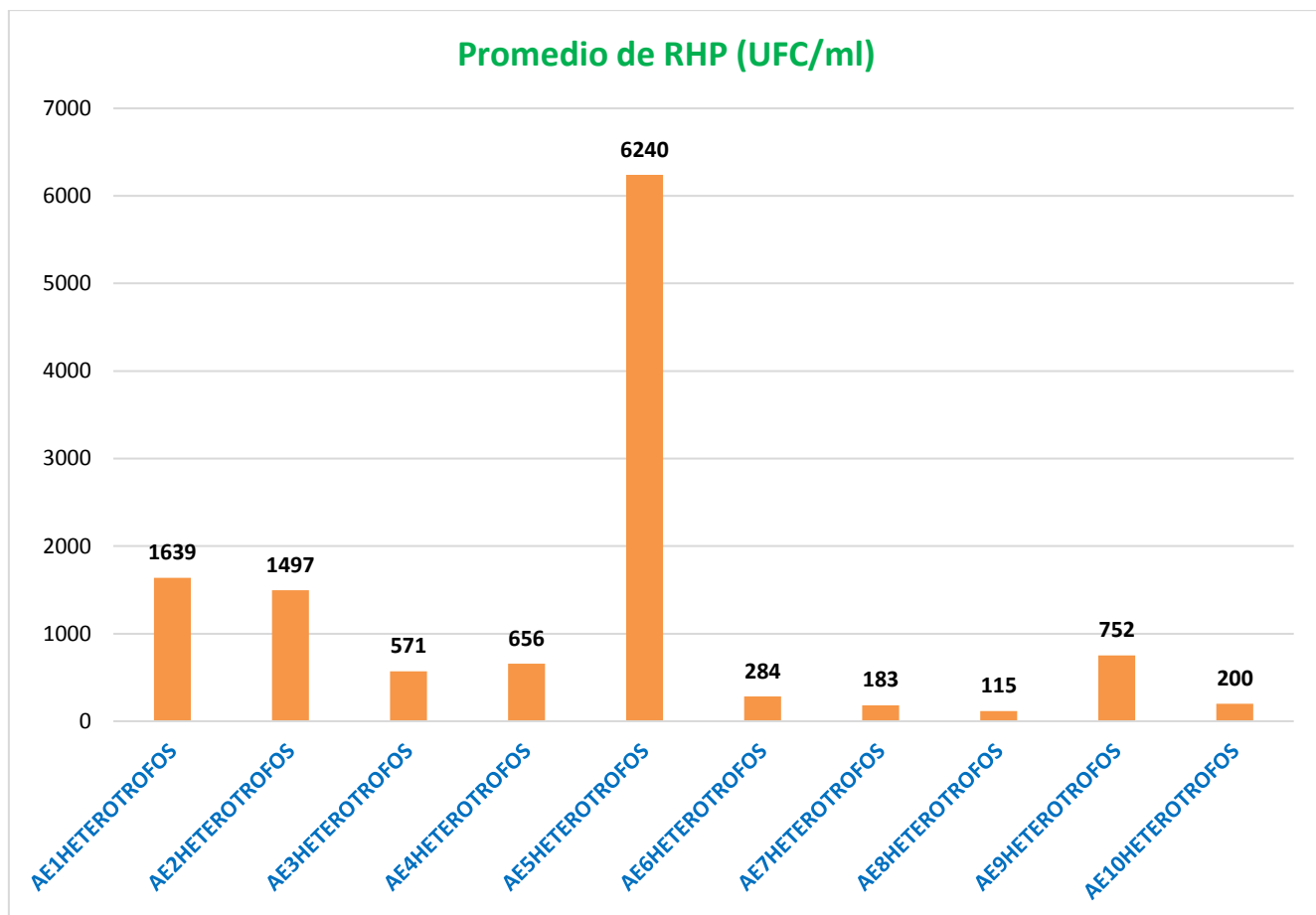


**Figura 10.** Prueba de Anova aplicada a concentración de Heterótrofos de las marcas evaluadas

### Interpretación:

De la prueba ANOVA podemos concluir, con un nivel de confianza del 95%, que al menos una de las concentraciones medias de heterótrofos de una de las marcas es diferente a las demás. Asimismo se concluye que la variación entre muestras es significativa.





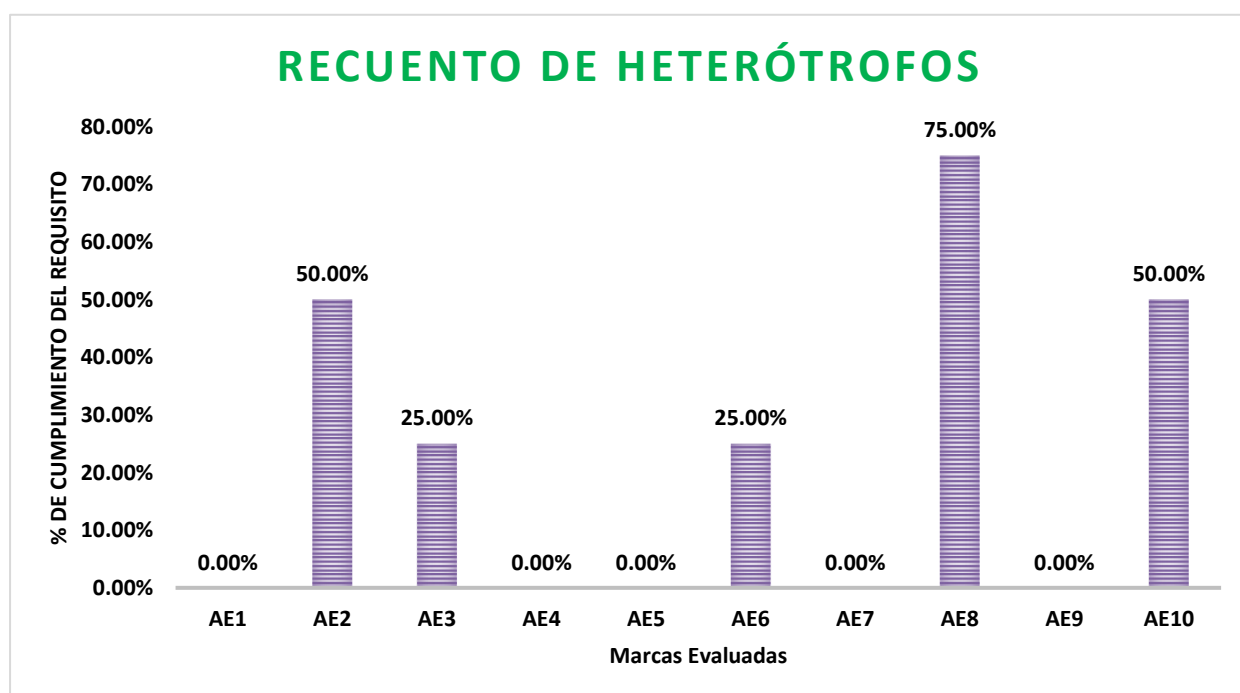
**Figura 11. Promedio de Recuento de Heterótrofos de cada marca evaluada en los 04 muestreos.**

**En la figura 11,** se observa los promedios de Heterótrofos encontrados en cada marca evaluada, por lo tanto podemos determinar que la marca con más bajo conteo de heterótrofos es la AE8, sin embargo está fuera de los límites establecidos por la NTS 071, que exige como mínimo que 2 unidades de muestra ( $n=2$ ) de las 5, estén en el rango de 10-100 UFC/ml. Mientras que la de mayor conteo en promedio de heterótrofos es la marca AE5, la cual supera exageradamente lo establecido en la norma sanitaria mencionada.

**Tabla 8. Cumplimiento de los valores de Heterótrofos en cada muestreo según- NTS 071**

	Marca	Muestreo 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	N° Éxito	%
<b>RECuento DE HETERÓTROFOS EN PLACA (UFC/ml)</b>	AE1	No cumple	No cumple	No cumple	No cumple	0	0.00%
	AE2	Cumple	Cumple	No cumple	No cumple	2	50.00%
	AE3	Cumple	No cumple	No cumple	No cumple	1	25.00%
	AE4	No cumple	No cumple	No cumple	No cumple	0	0.00%
	AE5	No cumple	No cumple	No cumple	No cumple	0	0.00%
	AE6	No cumple	No cumple	No cumple	Cumple	1	25.00%
	AE7	No cumple	No cumple	No cumple	No cumple	0	0.00%
	AE8	Cumple	No cumple	Cumple	Cumple	3	75.00%
	AE9	No cumple	No cumple	No cumple	No cumple	0	0.00%
	AE10	Cumple	Cumple	No cumple	No cumple	2	50.00%

Fuente: Elaboración propia



**Figura 12. Cumplimiento del requisito de Heterótrofos de cada marca en los 4 muestreos.**

- 0.00 %** = La marca evaluada no cumplió el requisito en ningún muestreo.
- 25.00 %** = La marca evaluada cumplió el requisito en uno de los cuatro muestreos.
- 50.00 %** = La marca evaluada cumplió el requisito en dos de los cuatro muestreos.
- 75.00 %** = La marca evaluada cumplió el requisito en tres de los cuatro muestreos.

### **3.2. Bacterias Coliformes**

**En las tablas 9 y 10**, se muestran los resultados obtenidos de bacterias Coliformes en los volúmenes de 100 y 250 ml respectivamente cada marca de agua durante los 4 muestreos, en donde según la NTS 071-2008, de las 5 unidades muestreadas ( $n=5$ ) ninguna debe mostrar evidencia de crecimiento ( $n=0$ ), para poder cumplir con éste requisito.

Se puede evidenciar que la marca AE4, es la que registra los recuentos más altos en volumen de 100 ml, durante el muestreo 4. Así mismo tanto la marca AE4 como la AE6 presentan los valores más altos en volumen de 250 ml, en los muestreos 4 y 3 respectivamente, que sobrepasan el límite de 100 UFC, según el método ISO 9308: 2014

**En las figuras 13 y 16**, muestran el comportamiento de las bacterias Coliformes de cada marca en los 4 muestreos, se aprecia que todas presentan recuentos de Coliformes en la mayoría de los muestreos, incumpliendo rotundamente con lo que exige la norma técnica sanitaria- NTS 071.

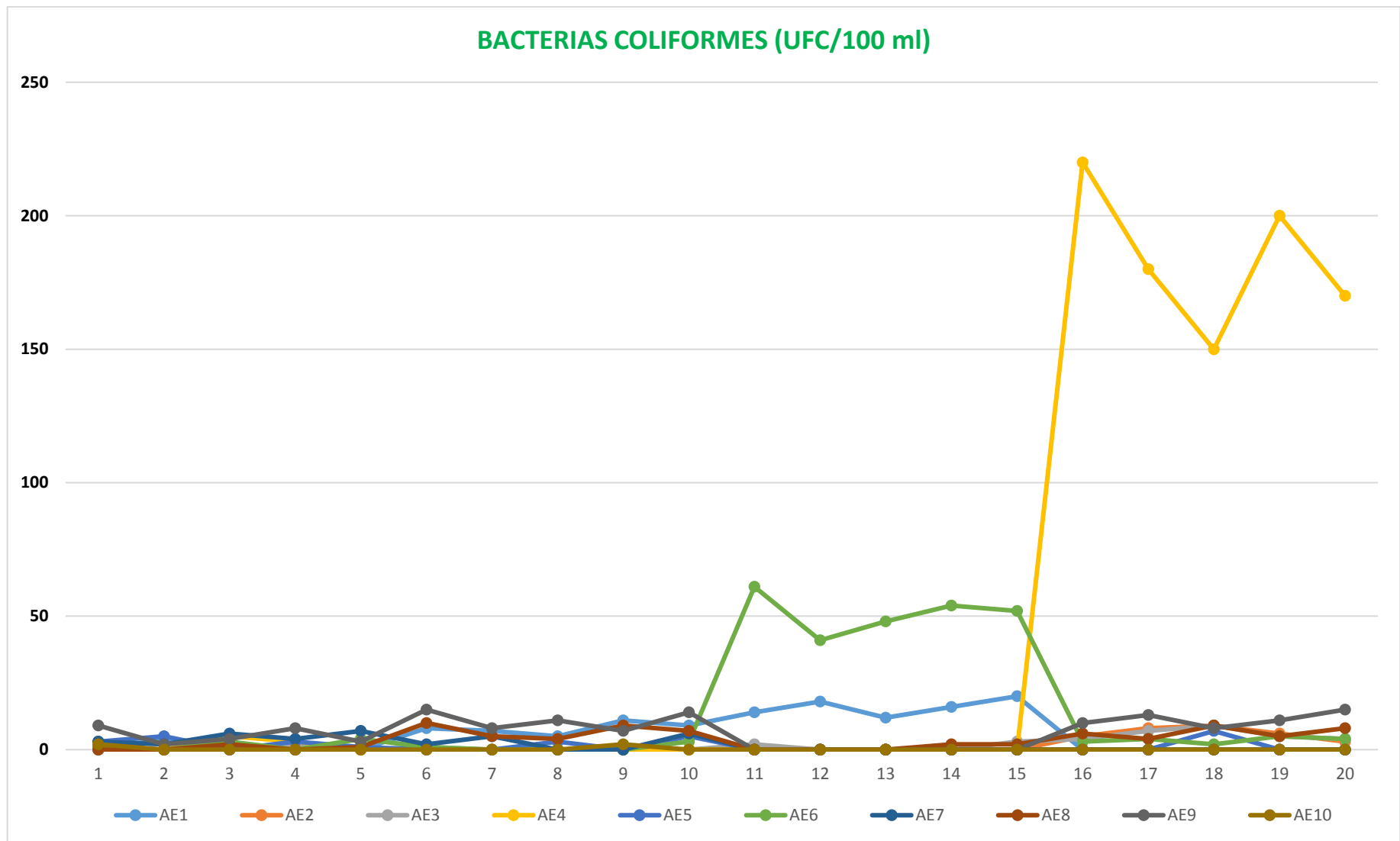
**Tabla 9. Bacterias Coliformes (UFC/100 ml) en cada marca de agua durante los 04 muestreos.**

Método	Marca	Muestreo 1 (18-19/06/2018)					Muestreo 2 (25-26/07/2018)					Muestreo 3 (21-22/08/2018)					Muestreo 4 (17-18/09/2018)				
		N1	N2	N3	N4	N5	N1	N2	N3	N4	N5	N1	N2	N3	N4	N5	N1	N2	N3	N4	N5
Enumeración de Bacterias Coliformes (UFC /100ml) (*)	AE1	< 1 B	4	< 1 B	< 1 B	< 1 B	8	7	5	11	9	14	18	12	16	20	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B
	AE2	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	5	8	9	6	3
	AE3	< 1 B	< 1 B	< 1 B	2	< 1 B	1	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	2	< 1 B	< 1 B	< 1 B	3	4	7	9	5	4
	AE4	1	< 1 B	5	3	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	220	180	150	200	170
	AE5	3	5	< 1B	3	1	< 1 B	< 1 B	3	< 1 B	5	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	7	< 1 B	< 1 B
	AE6	1	< 1 B	3	< 1 B	4	1	< 1 B	< 1 B	< 1 B	3	61	41	48	54	52	3	4	2	5	4
	AE7	3	2	6	4	7	2	5	< 1 B	< 1 B	6	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B
	AE8	< 1 B	< 1 B	2	< 1 B	1	10	5	4	9	7	< 1 B	< 1 B	< 1 B	2	2	6	4	9	5	8
	AE9	9	2	4	8	3	15	8	11	7	14	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	10	13	8	11	15
	AE 10	2	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	2	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B

Fuente: Elaboración propia

(\*) < 1B = 0 (Ausencia)

Obtención de valores (ver anexo XI)



**Figura 13. Comportamiento de bacterias Coliformes en cada marca en los 4 muestreos**

## COLIFORMES

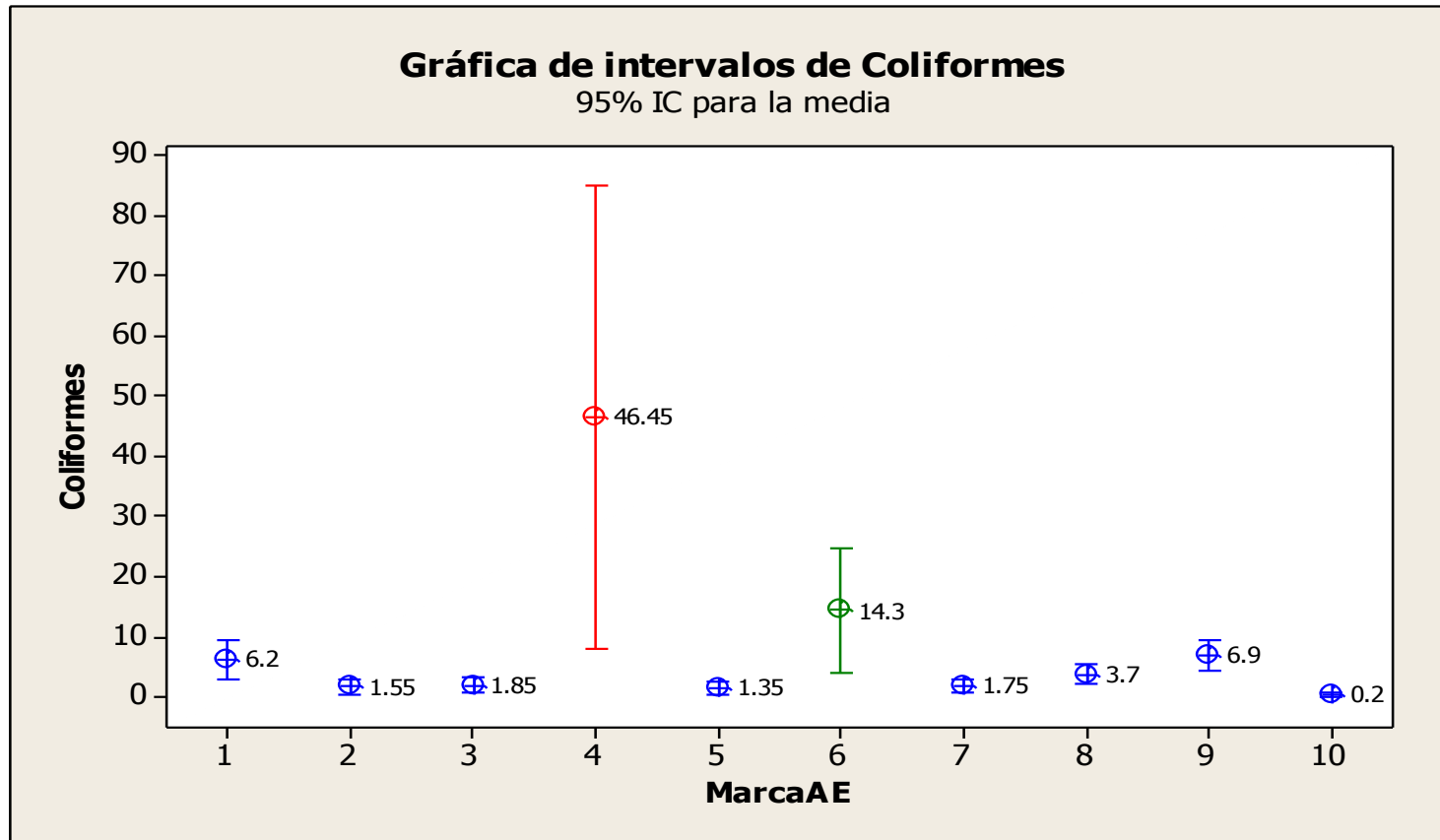
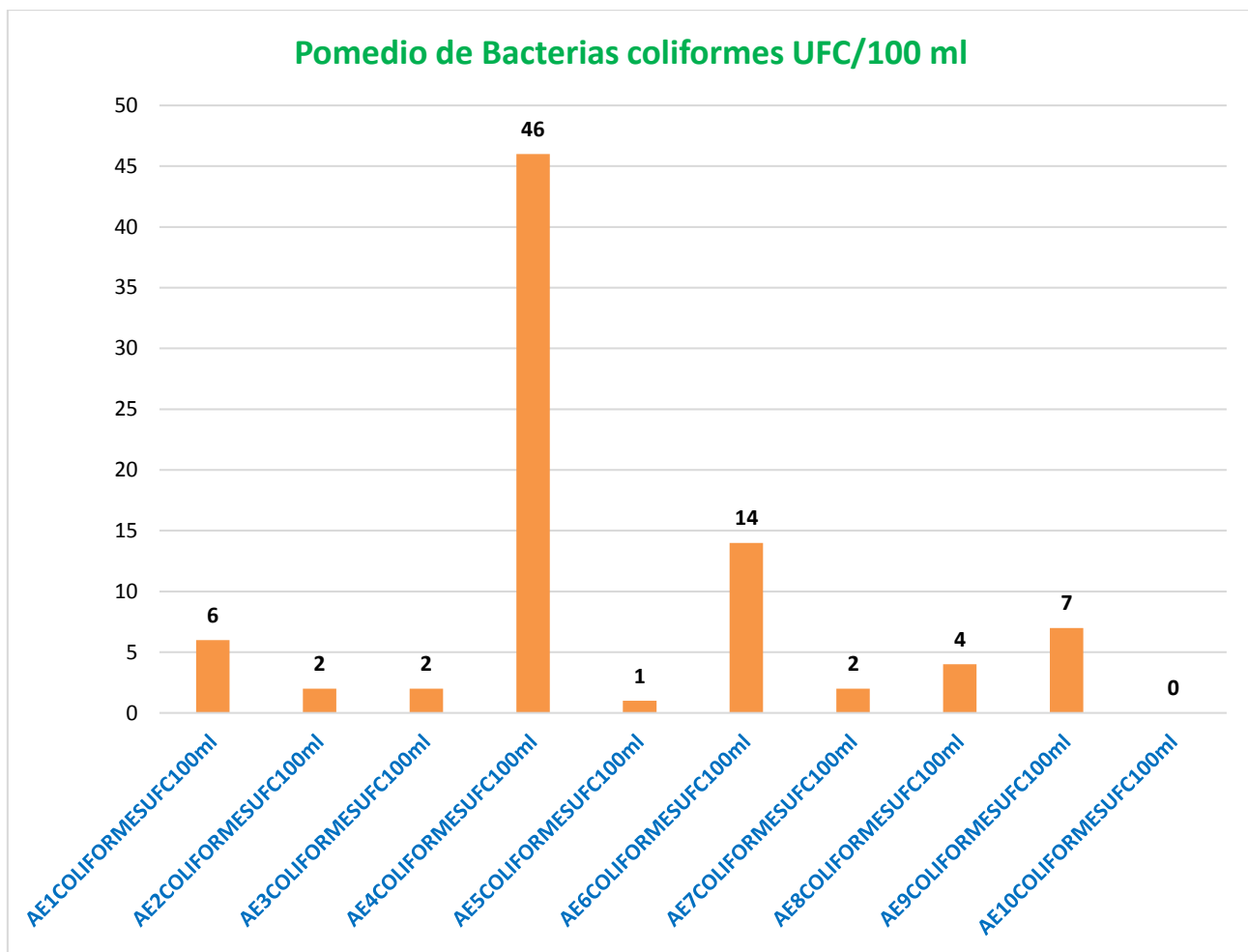


Figura 14. Prueba de Anova aplicada a concentración de bacterias coliformes de las marcas evaluadas

### Interpretación:

De la prueba ANOVA podemos concluir, con un nivel de confianza del 95%, que al menos una de las concentraciones medias de bacterias coliformes de una de las marcas es diferente a las demás. Asimismo se concluye que la variación entre muestras es significativa.



**Figura 15. Promedio de Bacterias Coliformes de cada marca durante los 4 muestreos.**

**En la figura 15**, se observa los promedios obtenidos de manera gráfica, por lo que podemos determinar que la marca con más bajo recuento de bacterias coliformes en promedio es la AE10 y luego la AE5, mientras que la marca AE4 presenta el mayor recuento en promedio de 46 UFC/ml. Por lo tanto, los valores superan lo establecido en la NTS 071, la cual exige < 1.1 (ausencia total de Coliformes).

**Tabla 10. Bacterias Coliformes (UFC 250 ml) en cada marca de agua durante los 04 muestreos**

Método	Marca	Muestreo 1 (18-19/06/2018)					Muestreo 2 (25-26/07/2018)					Muestreo 3 (21-22/08/2018)					Muestreo 4 (17-18/09/2018)				
		N1	N2	N3	N4	N5	N1	N2	N3	N4	N5	N1	N2	N3	N4	N5	N1	N2	N3	N4	N5
Enumeración de Bacterias Coliformes (*) (UFC/250 ml)	AE1	3	9	< 1B	< 1B	4	14	11	9	18	15	32	40	33	35	44	< 1B	< 1B	4	< 1B	3
	AE2	< 1B	< 1B	< 1B	< 1B	< 1B	< 1B	< 1B	< 1B	< 1B	< 1B	< 1B	5	< 1B	4	3	15	21	24	10	5
	AE3	< 1B	< 1B	< 1B	3	< 1B	1	< 1B	< 1B	< 1B	< 1B	5	< 1B	3	< 1B	7	9	18	16	14	12
	AE4	4	< 1B	11	7	< 1B	< 1B	4	< 1B	3	< 1B	< 1B	< 1B	< 1B	2	< 1B	100	100	100	100	100
	AE5	5	8	2	7	6	< 1B	2	5	< 1B	7	1	< 1B	2	< 1B	2	7	4	12	5	3
	AE6	2	2	8	< 1B	11	2	< 1B	< 1B	< 1B	5	100	100	100	100	100	7	7	5	13	9
	AE7	10	6	10	9	19	9	11	5	3	14	< 1B	1	< 1B	< 1B	1	< 1B	< 1B	< 1B	< 1B	< 1B
	AE8	< 1B	< 1B	3	< 1B	1	15	9	10	14	10	< 1B	< 1B	< 1B	3	5	14	7	13	9	12
	AE9	14	5	9	10	8	25	12	22	13	24	< 1B	< 1B	< 1B	< 1B	< 1B	21	30	18	25	34
	AE10	3	< 1B	2	< 1B	< 1B	< 1B	< 1B	< 1B	5	< 1B	< 1B	< 1B	< 1B	< 1B	< 1B	< 1B	< 1B	< 1B	< 1B	< 1B

Fuente: Elaboración propia

(\*) < 1B = 0 (Ausencia)

Obtención de valores (ver anexo XI)



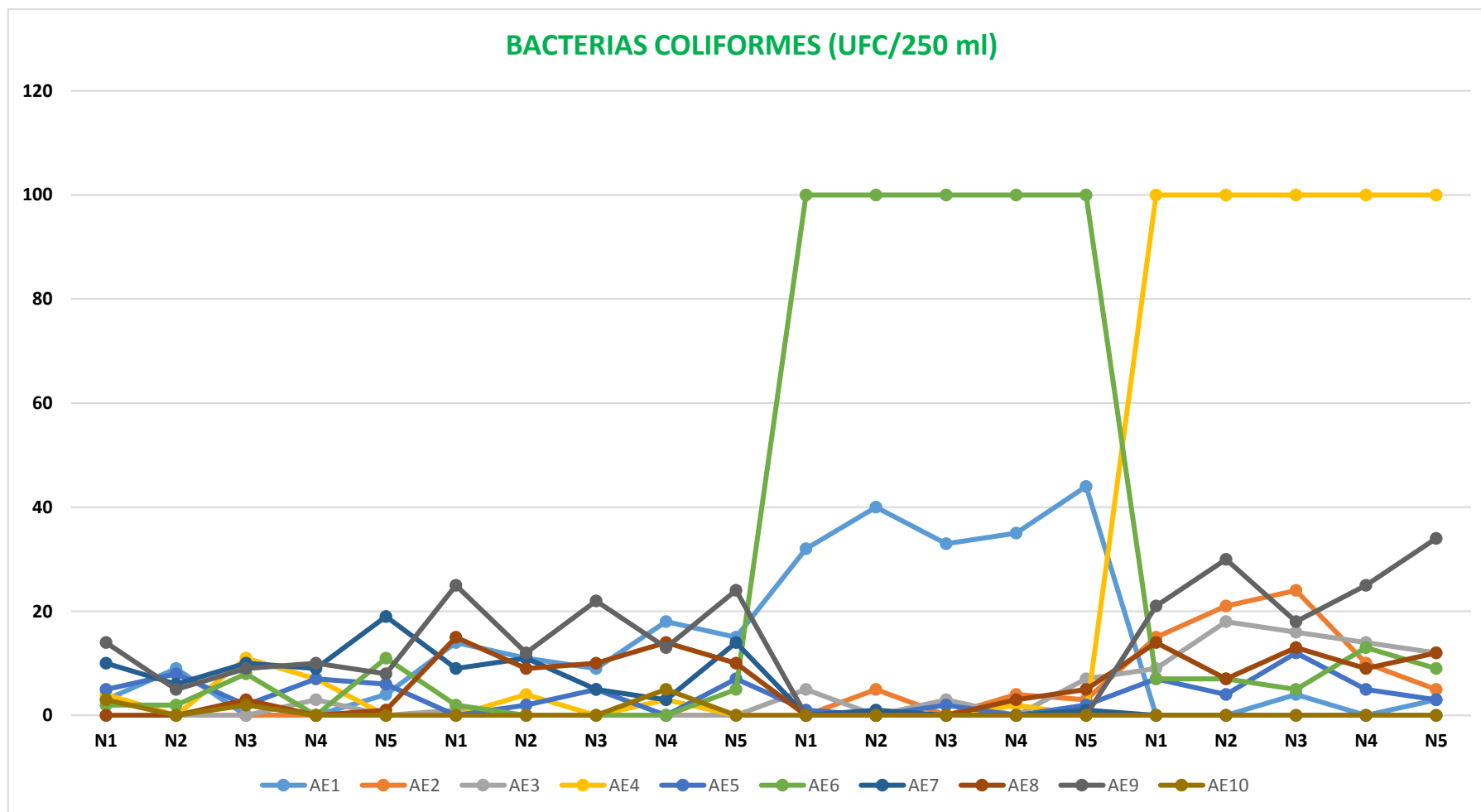
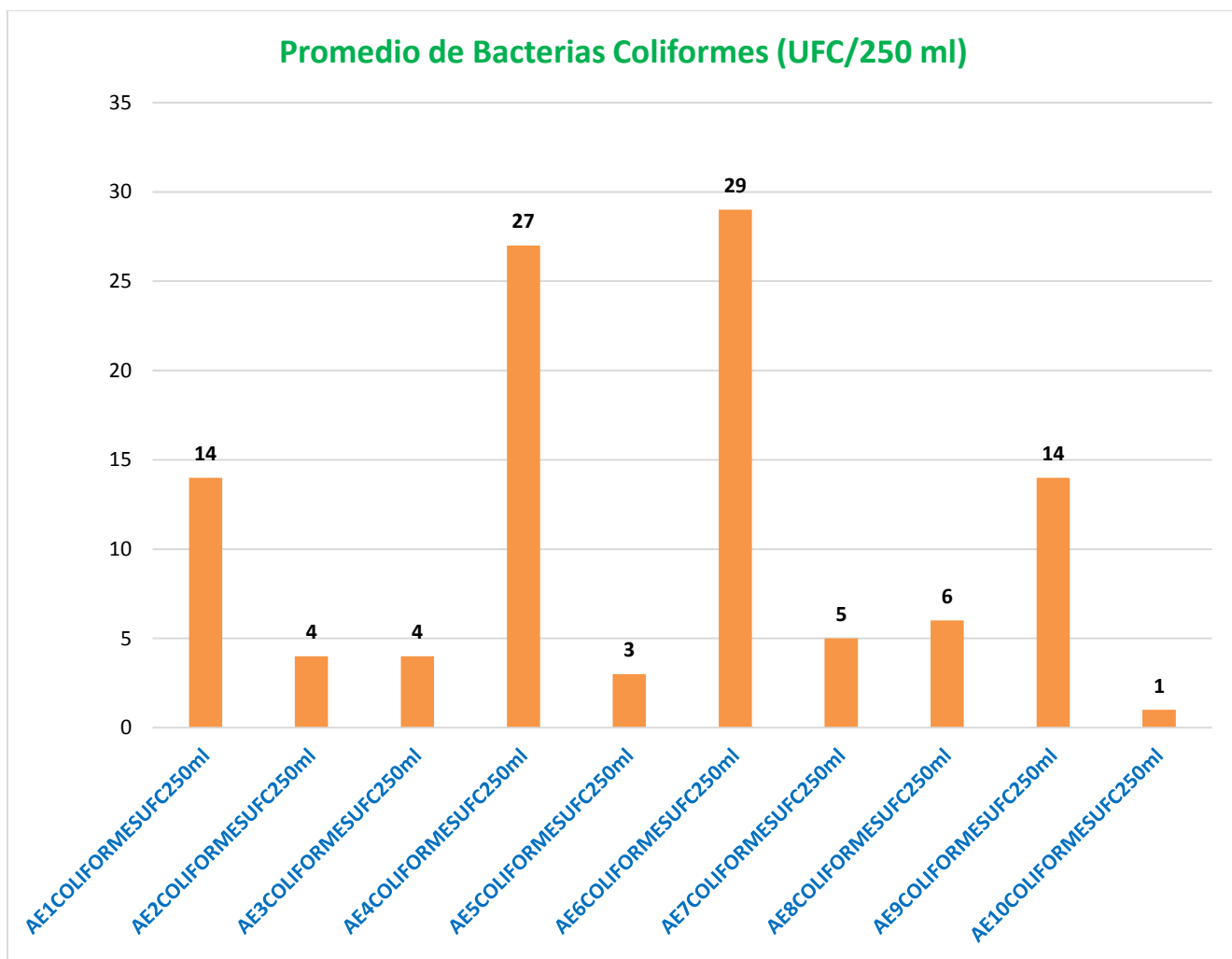


Figura 16. Comportamiento de bacterias Coliformes (UFC/ 250 ml) en cada marca en los 4 muestreos.



**Figura 17. Promedio de Bacterias Coliformes (UFC/250ml) durante los 4 muestreos.**

**En la figura 17**, se aprecian todos los promedios de coliformes en 250 ml de cada marca, por lo tanto se determina que la marca con más bajo recuento es la AE10, y las marcas con mayor recuento son AE6 y AE4 en las que se obtuvieron recuentos en promedio de 29 y 27 UFC, respectivamente, incumpliendo una vez más lo que establece la NTS 071.

### 3.3. Coliformes Termotolerantes

**En la tabla 11**, se registran los resultados que se obtuvieron del análisis de coliformes Termotolerantes de cada marca de agua durante los 4 muestreos. Demostrando que existe cumplimiento con éste requisito bacteriológico, en función de lo que establece el DS N° 031-2010, el cual exige 0 UFC/100ml. Cabe señalar que la marca AE9 fue la única que en el muestreo 1 en 3 (n=3) de las 5 unidades de muestreo presentó valores cuantificables, con la salvedad que en los 3 muestreos siguientes no se volvieron a encontrar recuentos.

**En la figura 18**, se observa el comportamiento de las bacterias coliformes de cada marca en los 4 muestreos, en donde se aprecia que no existe tendencia en función a los valores encontrados.

### 3.4. Enumeración de *Escherichia coli*

**En la tabla 13**, se registran los resultados obtenidos de los valores de *Escherichia coli*, de cada marca, durante los 4 muestreos. Se observa que todas las marcas cumplen al 100% (4 muestreos), con éste requisito. El límite máximo permisible es 0 UFC/ 100mL, según lo exigido por el DS N° 031-2010.

**En la figura 19**, se muestra el comportamiento no cuantificable de *Escherichia coli* de las marcas evaluadas durante toda la investigación.

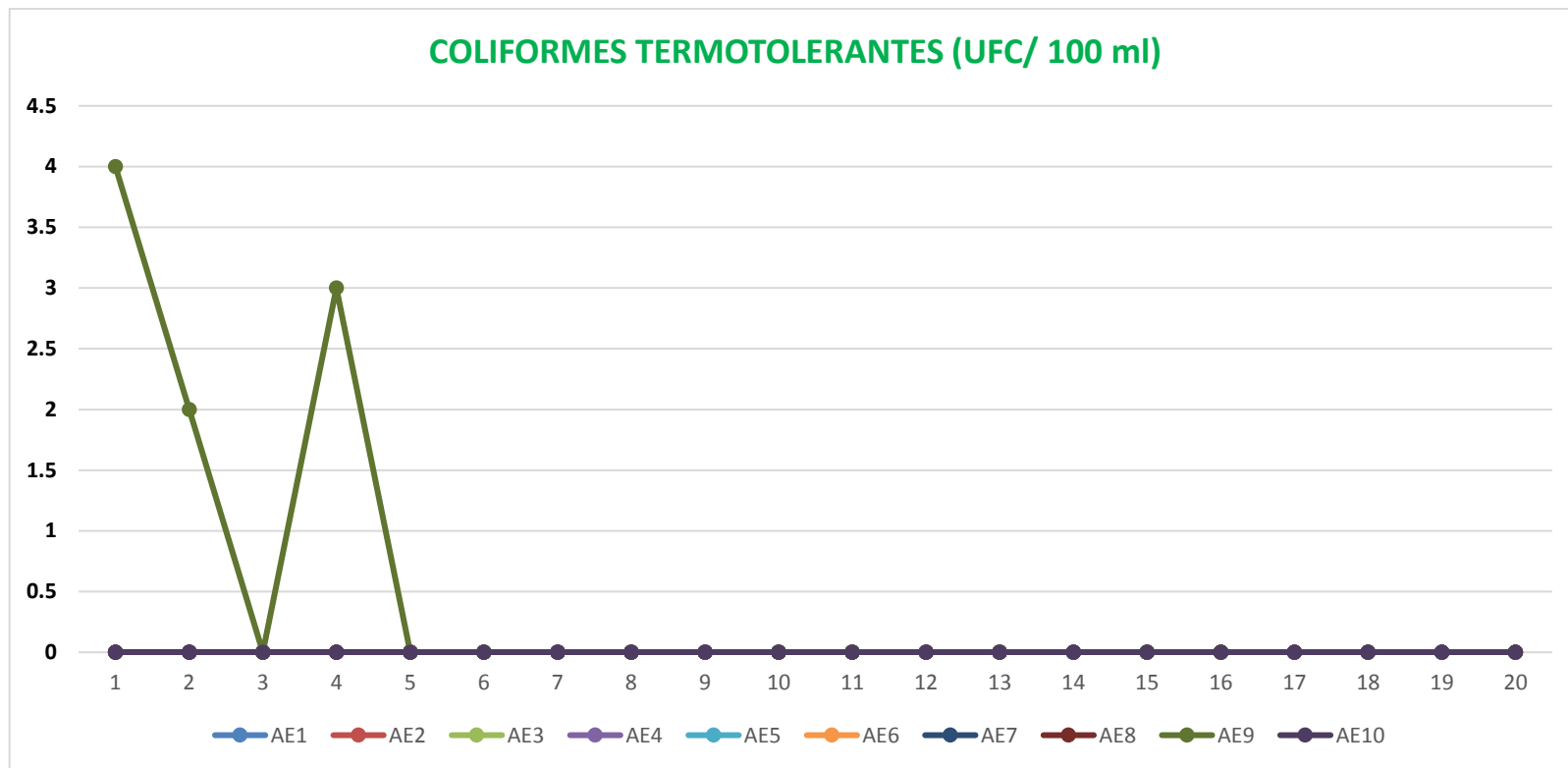
**Tabla 11. Coliformes Termotolerantes (UFC/100 ml) de cada marca de agua durante los 04 muestreos.**

		Muestreo 1 (18-19/06/2018)					Muestreo 2 (25-26/07/2018)					Muestreo 3 (21-22/08/2018)					Muestreo 4 (17-18/09/2018)					
Método	Marca	N1	N2	N3	N4	N5	N1	N2	N3	N4	N5	N1	N2	N3	N4	N5	N1	N2	N3	N4	N5	
Coliformes Termotolerantes (UFC/ 100ml) (*)	AE1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	
	AE2	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	
	AE3	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	
	AE4	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	
	AE5	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	
	AE6	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
	AE7	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
	AE8	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
	AE9	4	2	< 1	3	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
	AE10	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1

Fuente: Elaboración propia

(\*) < 1 = 0 (Ausencia)

Obtención de valores (**ver anexo XII**)



**Figura 18. Comportamiento de Coliformes Termotolerantes de cada marca en los 4 muestreos.**

**Tabla 12. Media y desviación estándar del número de coliformes termotolerantes (UFC/100 ml)**

Método: Coliformes Termotolerantes (UFC/100 ml)		
Marca	Media	Desviación típica
AE1	0	0
AE2	0	0
AE3	0	0
AE4	0	0
AE5	0	0
AE6	0	0
AE7	0	0
AE8	0	0
AE9	0	0
AE10	0	0

Fuente: Elaboración propia

Como se observa en la **tabla 12**, todas las marcas de agua embotellada, en promedio no obtuvieron recuentos de coliformes termotolerantes, en consecuencia se obtuvo una desviación estándar de 0.

Por lo tanto, todas las marcas de agua en promedio cumplen con éste requisito, según lo establecido por el DS N°031, cuyo límite máximo permisible es **0 UFC/ 100 ml**.

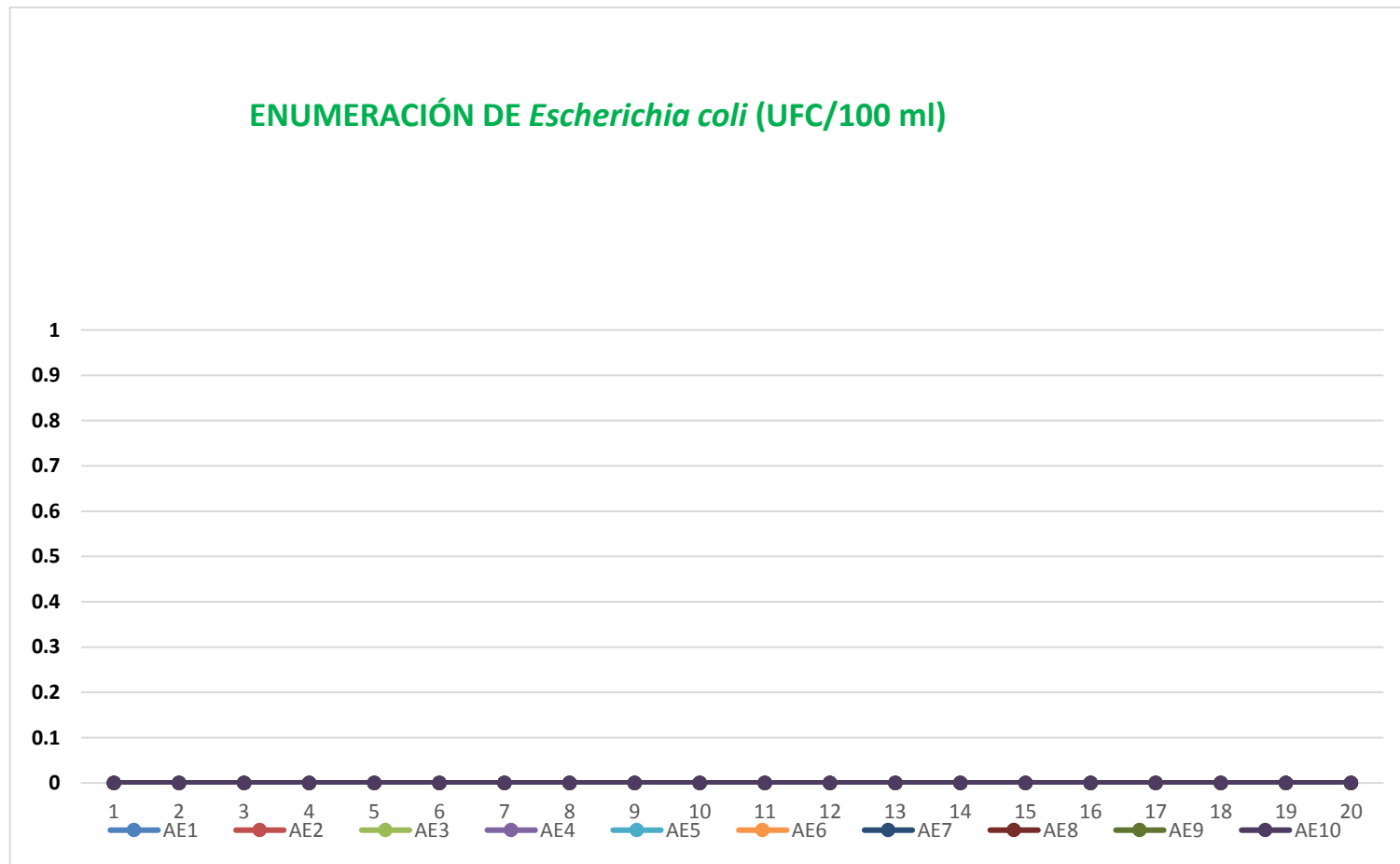
**Tabla 13. *Escherichia coli* (UFC/100 ml) en cada marca de agua durante los 04 muestreos.**

Método	Marca	Muestreo 1 (18-19/06/2018)					Muestreo 2 (25-26/07/2018)					Muestreo 3 (21-22/08/2018)					Muestreo 4 (17-18/09/2018)				
		N1	N2	N3	N4	N5	N1	N2	N3	N4	N5	N1	N2	N3	N4	N5	N1	N2	N3	N4	N5
Enumeración de <i>Escherichia coli</i> (UFC/100 ml) (*)	AE1	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B
	AE2	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B
	AE3	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B
	AE4	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B
	AE5	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B
	AE6	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B
	AE7	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B
	AE8	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B
	AE9	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B
	AE10	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B	<1B

Fuente: Elaboración propia

(\*) < 1B equivale = 0 (Ausencia)

Obtención de valores (**ver anexo XI**)



**Figura 19. Comportamiento de *E. coli* de cada marca en los 4 muestreos.**



**Tabla 14. Media y desviación estándar del número de *Escherichia coli*.**

Método: Enumeración de <i>Escherichia coli</i> (UFC/100 ml)		
Marca	Media	Desviación típica
AE1	0	0
AE2	0	0
AE3	0	0
AE4	0	0
AE5	0	0
AE6	0	0
AE7	0	0
AE8	0	0
AE9	0	0
AE10	0	0

Fuente: Elaboración propia

Como se observa en la **tabla 14**, todas las marcas de agua embotellada, en promedio no obtuvieron recuentos de *Escherichia coli*, en consecuencia se obtuvo una desviación estándar de 0.

Por lo tanto, todas las marcas de agua en promedio cumplen con éste requisito, según lo establecido por el DS N°031-2010, cuyo límite máximo permisible es **0 UFC/ 100 ml**.

### 3.5. Detección de *Pseudomonas aeruginosa*

**En la tabla 15**, se observa los resultados de la detección de éste patógeno de cada marca de agua en los 4 muestreos, determinando Presencia (P) y Ausencia (A) en 100 ml de volumen. El valor aceptado es Ausencia /100 ml en las 5 unidades de muestra (n=5), según lo exigido por la NTS 071-2008.

**En la figura 20**, se puede observar que de las 10 marcas evaluadas, solo la marca AE2 presenta ausencia al 100% durante los cuatro muestreos y cumple con el requisito exigido en la NTS 071. En contraste las 9 marcas restantes presentaron *Pseudomonas aeruginosa* en alguno de los cuatro muestreos, incumpliendo lo exigido por la norma sanitaria mencionada.

Por lo tanto podemos determinar que solo la marca AE2, cumple con lo exigido por la norma sanitaria en los 4 muestreos.

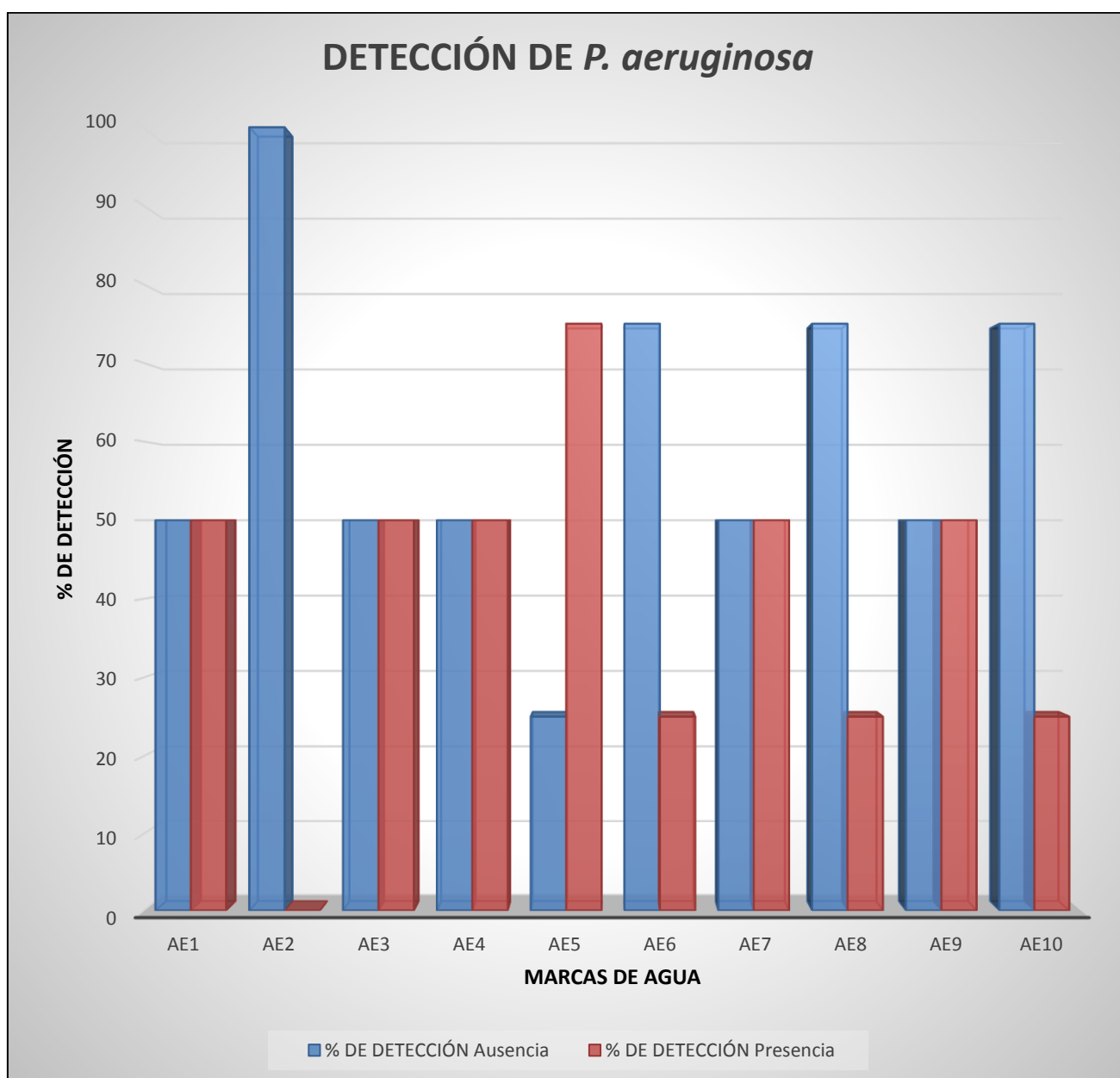
Es importante señalar que todos los requisitos deben cumplirse al 100% para tener un producto inocuo y de buena calidad.

**Tabla 15. *P. aeruginosa* en 100 ml en cada marca de agua durante los 04 muestreos.**

Método	Marca	Muestreo 1 (18-19/06/2018)					Muestreo 2 (25-26/07/2018)					Muestreo 3 (21-22/08/2018)					Muestreo 4 (17-18/09/2018)				
		N1	N2	N3	N4	N5	N1	N2	N3	N4	N5	N1	N2	N3	N4	N5	N1	N2	N3	N4	N5
Detección de <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> / 100 ml	AE1	P	P	P	P	P	A	A	A	A	A	P	P	P	P	P	A	A	A	A	A
	AE2	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	AE3	P	P	P	P	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	P	P	P	P	P
	AE4	A	A	A	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	A	A	A	A
	AE5	A	A	A	A	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
	AE6	P	P	P	P	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	AE7	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	AE8	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	P	P	P	P	P
	AE9	P	P	P	P	P	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	P	P	P	P	P
	AE10	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	P	P	P	P	P	A	A	A	A	A

Fuente: Elaboración propia

P= Presencia; A= Ausencia



**Figura 20.** Porcentaje de detección de *P. aeruginosa* en cada marca de agua

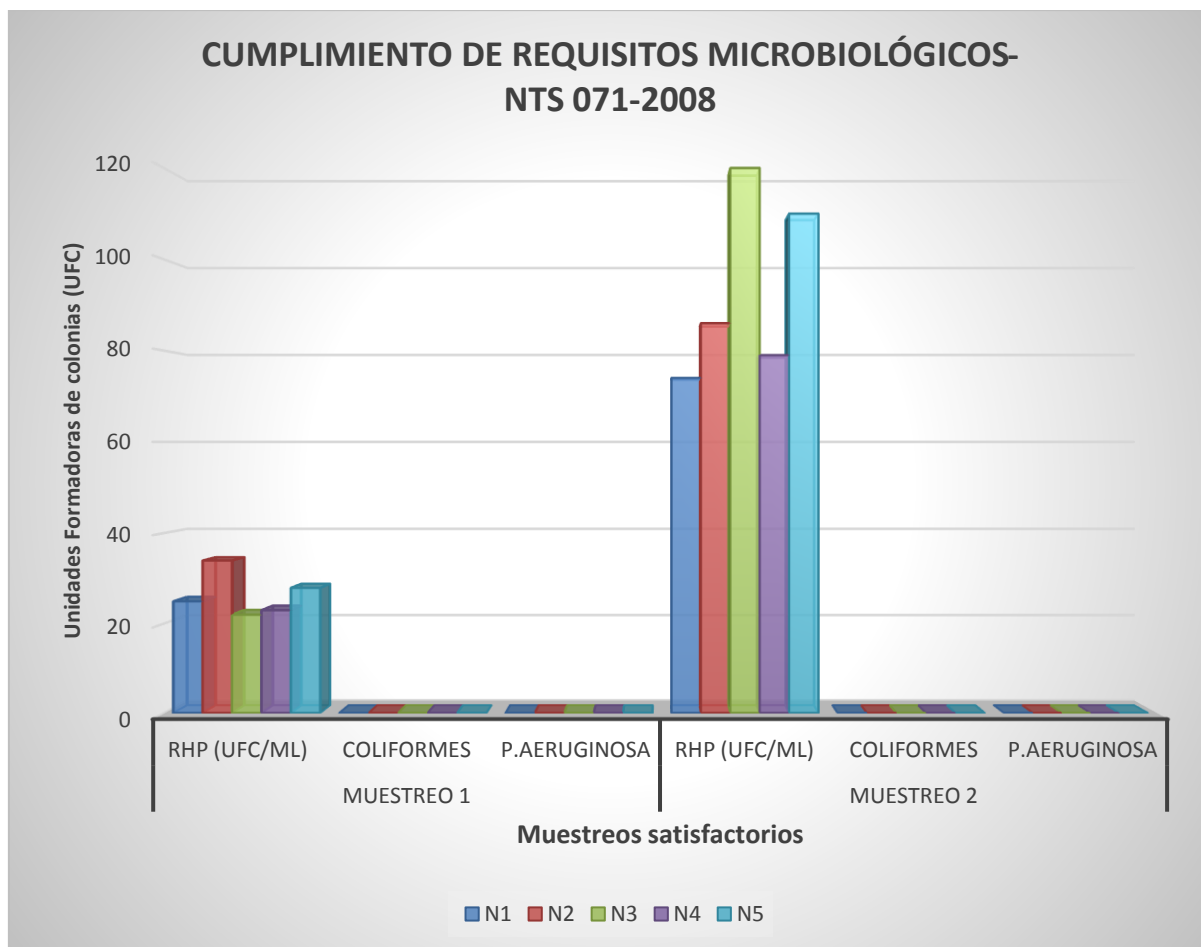
Como evaluación general de los resultados, de todas las marcas de **agua embotellada, AE2** cumplió rigurosamente con los valores de los métodos exigidos por la NTS 071-2008.

Con la salvedad, que solo se observó en los 2 primeros muestreos, de manera que en los 2 últimos se obtuvieron resultados que excedían considerablemente los límites permitidos en Heterótrofos y bacterias Coliformes por la norma mencionada. A continuación se detallan los resultados en los 2 primeros muestreos para ésta marca en particular (**Tabla 16 y Figura 21**):

**Tabla 16. Cumplimiento de requisitos microbiológicos de la marca AE2- según NTS 071-2008**

Marca:	AE2	UNIDADES DE MUESTRA (N=5)				
Muestreo satisfactorio	Agente Microbiano	N1	N2	N3	N4	N5
Muestreo 1	Recuento de Heterótrofos en placa (RHP)	25	34	22	23	28
	Bacterias Coliformes	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B
	<i>P. aeruginosa</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Muestreo 2	Recuento de Heterótrofos en placa (RHP)	74	86	120	79	110
	Bacterias Coliformes	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B	< 1 B
	<i>P. aeruginosa</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

(\*) < 1B = 0



**Figura 21. Demostración de muestreos exitosos de la marca AE2**

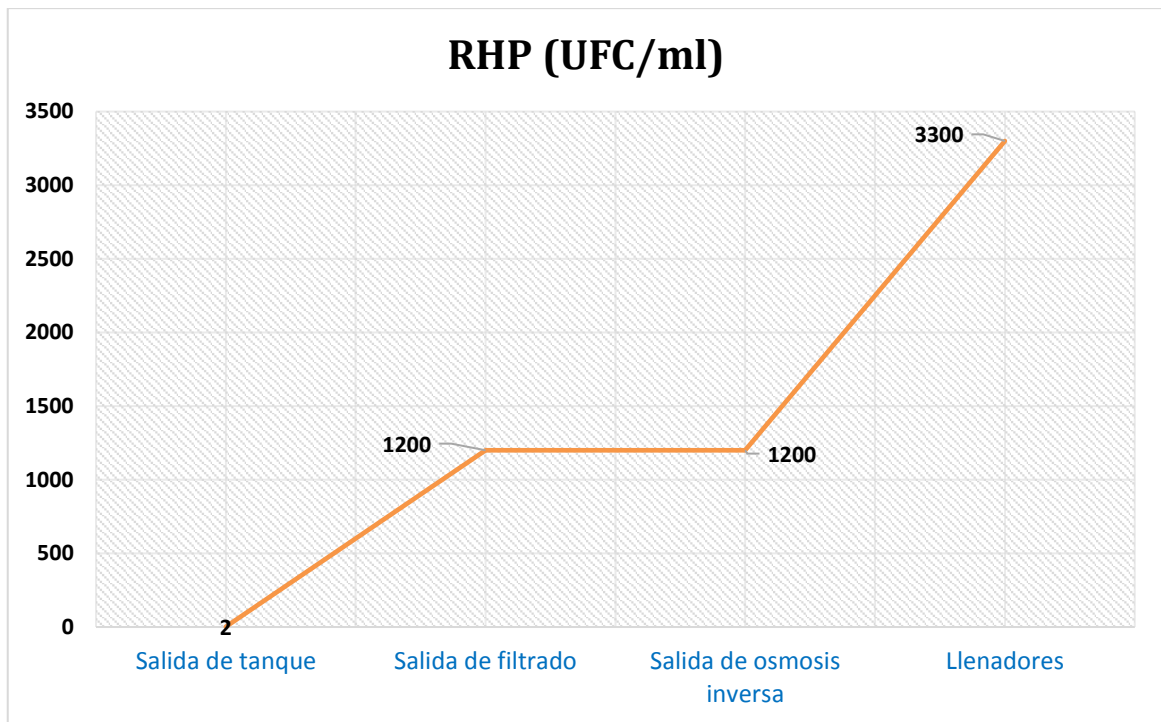
Con el objetivo de analizar y determinar los factores que generaban la contaminación del agua producida en las plantas del distrito de Castilla, se pudo acceder en una sola oportunidad a las instalaciones de una de las marcas evaluadas codificada como AE1. En esa visita se monitoreó la eficiencia del sistema de purificación que se empleaba, para ello se muestreó 4 puntos del flujo, identificados como P1 (salida del tanque de agua), P2 (Salida del sistema de filtrado), P3 (Salida de ósmosis inversa) y P4 (Sistema de llenado).

Paralelamente se inspeccionó la infraestructura de la planta, las condiciones de almacenamiento y de limpieza.

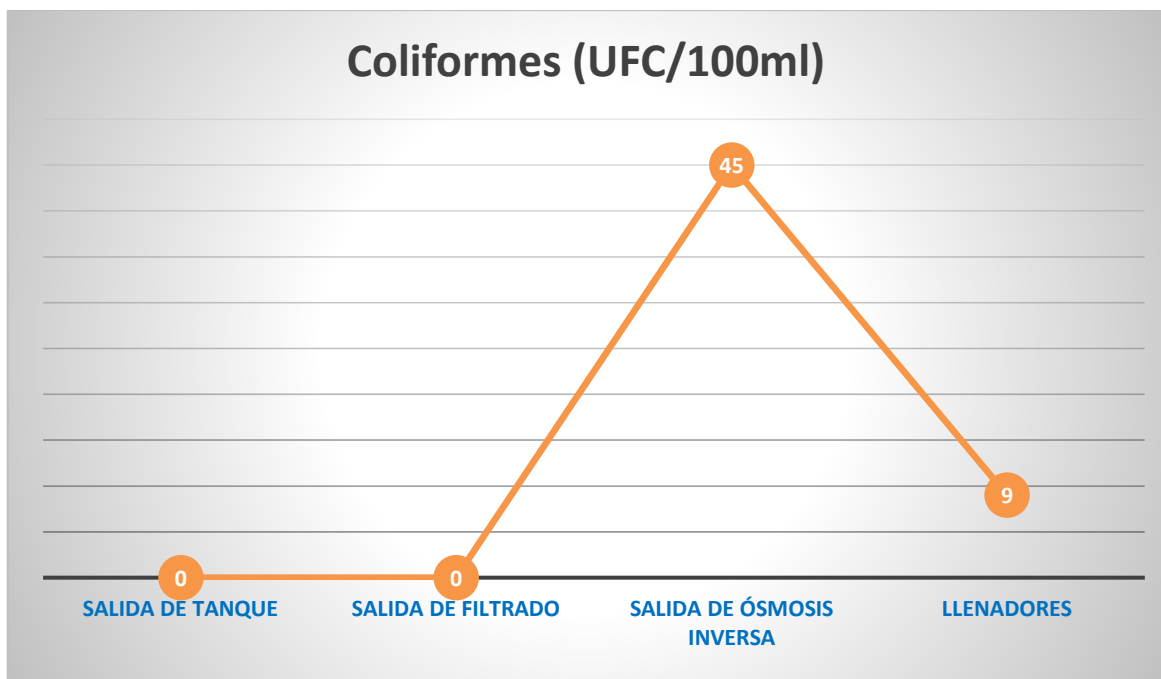
Los resultados que se obtuvieron se muestran en la tabla 17 y en las figuras 22, 23 y 24.

**Tabla 17. Evaluación del proceso de purificación en bases a los requisitos de NTS 071**

Etapas del proceso de tratamiento	Métodos evaluados (Fecha de evaluación: 17/08/2018)		
	RHP (UFC/ml)	Coliformes (UFC/100ml)	Detección de <i>P.aeruginosa</i> /100ml
P1: Salida de tanque de agua	2	0	Ausencia
P2: Salida del sistema de filtrado	1200	0	Ausencia
P3: Salida de ósmosis inversa	1200	41	Presencia
P4: Sistema de llenado	3300	9	Presencia

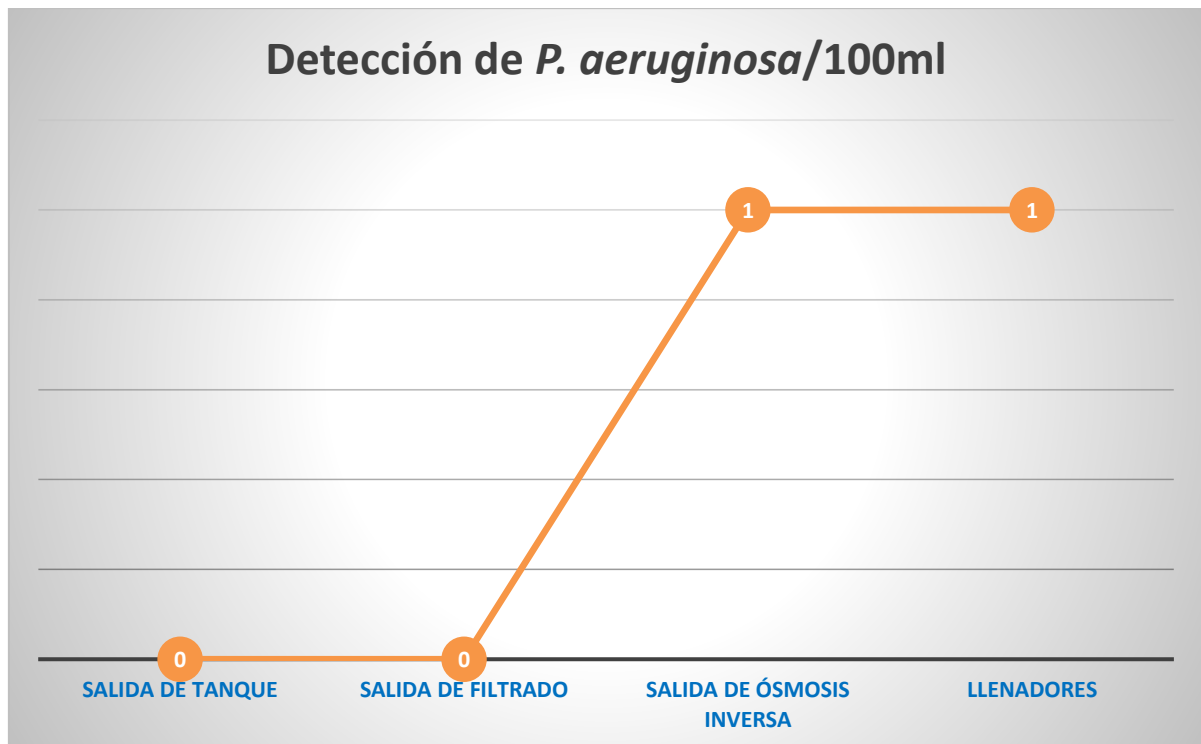


**Figura 22. Recuento de Heterótrofos en cada etapa del tratamiento**



**Figura 23. Bacterias Coliformes en cada etapa del tratamiento**





Se categorizó: Ausencia = 0; Presencia = 1

**Figura 24. Detección de *P. aeruginosa* en cada etapa del tratamiento.**

Con respecto a la infraestructura de la planta se encontró en buenas condiciones, con pisos y paredes lisas, luces empotradas, mesas de acero inoxidable y sin evidencia de hacinamiento.

En los almacenes cada ambiente tenía lo antes mencionado, además de sistemas de ventilación, pero carecía de sistema de aire acondicionado, no tenían termohigrómetros para un mejor control de temperatura y humedad, así como falta de deshumecedores.

#### IV. DISCUSIÓN

Quijada (2015), Zamorano-Honduras, sostiene que las fuentes de abastecimiento utilizados por las plantas de embotellado provienen de la red pública y de pozos privados, en su investigación el 63% de las plantas obtienen agua de pozos privados, mientras que el 37% se abastece de la red pública. En ésta investigación se puede afirmar que el 100% de las marcas evaluadas utilizan como fuente de abastecimiento la red pública.

Quijada (2015) manifiesta que existe una gran variedad en los tratamientos de purificación de agua, lavado y desinfección de botellones en las plantas, estudios afirman que la combinación de luz UV y ozono es la más utilizada a nivel mundial en el tratamiento de agua por su alta efectividad en la reducción de carga bacteriana. Durante nuestra investigación, a partir de la información proporcionada por los bidones de 20 L, de cada marca durante todos los muestreos, se determinó que el 80% de éstas, utilizan como tratamiento de purificación la ósmosis inversa, el 60% reciben tratamiento de rayos ultravioleta, el 80% utilizan ozono como tratamiento de esterilización y el 40% utilizan la técnica de filtración dentro de las cuales una empresa emplea el nanofiltrado y 3 de ellas emplean el microfiltrado (**Tabla 6**). Haciendo un análisis de los resultados se puede evidenciar que las marcas de agua sometidas a la combinación de ozono y luz UV, presentan concentraciones menores de microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, y bacterias coliformes tanto en 100 ml como en 250. En las marcas AE2, AE10, AE3 y AE7.

Para la enumeración de bacterias Coliformes totales, Zavalaga (2012), Tacna-Perú, detalla en su investigación que de las 11 marcas que evaluó, 6 dieron resultados positivos; indicando que las buenas prácticas de producción no fueron las mejores y que influyeron en la calidad del producto. Así mismo León & Neira (2013), Cuenca-Ecuador, dan a conocer que de un total de 72 bidones de agua embotellada de 20 L, el 92% presentaba 1 a más UFC/ 100 ml, de coliformes totales mediante la técnica de filtración de membrana. Además; Quijada (2015), manifiesta que en las muestras de bidones reutilizables presentaron contaminación por coliformes totales un 72% del total de las muestras. Estos resultados anteceden a los nuestros, en donde se afirma que de las 10 marcas de agua evaluadas el 100% presenta resultados positivos que claramente exceden lo establecidos por las normas nacionales (NTS 071 y el DS N° 031), las cuales exigen recuentos iguales a 0 UFC/100 ml, para poder cumplir con este requisito y aceptar el lote de producción o muestra evaluada.

En las figuras 15 y 17, se muestran recuentos en promedio de cada marca evaluada, en la primera tabla el volumen filtrado fue de 100 ml y en la última de 250 ml, por lo tanto se puede establecer que existe correlación entre los resultados obtenidos, obteniendo siempre valores mayores en los volúmenes de 250 ml; con excepción de la marca AE4, que presentó en promedio 46 UFC/100 ml de bacterias Coliformes, mientras que en el volumen de 250 ml en promedio se obtuvo 27 UFC. Ésta diferencia se debe a que en el muestreo 4 en el volumen de 100 ml los recuentos superaban el límite establecido por el método ISO 9308:2014, que es de 100 UFC por membrana, por lo que se tuvo que realizar diluciones de muestra de 10 ml, para obtener recuentos que estén dentro de los límites y al momento de expresar el resultado en 100 ml se tuvo que emplear la fórmula y se obtuvieron los recuentos plasmados en el la **tabla 9**, en defecto para el volumen de 250 ml también supera el límite pero no se hizo dilución de muestra, ya que solo se consideró trabajar con el volumen de 100 ml y se reportó como 100 como límite máximo, de esta forma se registra en la **tabla 10**.

En la evaluación de coliformes Termotolerantes, Marchand (2002), Lima-Perú, sostiene en su investigación que el agua procedente de la red pública no presentó contaminación microbiológica, pero si se evidenció en el sistema de abastecimiento y distribución de los inmuebles, en donde el 17,86% presentó contaminación, de éste el 52.5% fue por coliformes termotolerantes.

según Marchand, se interpreta que la contaminación probablemente se pudo generar durante la instalación o distribución del flujo de proceso, debido a una deficiente o nula aplicación de buenas prácticas de manufactura, más no directamente de la red pública de abastecimiento.

Nuestros resultados afirman que de las 10 marcas evaluadas el 100% cumplen con lo exigido por el DS N° 031, el cual exige que los valores de coliformes Termotolerantes deben ser igual a 0 UFC/100 ml para tener un producto inocuo. Es importante mencionar que durante el muestreo 1, la marca AE9 evidenció resultados positivos en 3 de las 5 unidades de muestra (**Tabla 11**), pero en los 3 siguiente muestreos no se obtuvieron recuentos, cumpliendo con lo requerido por la norma, es por esto que los promedios obtenidos fueron cero (**Tabla 12**).

Con respecto a la evaluación de *Escherichia coli*, se determinó que de las 10 marcas evaluadas todas dieron resultados igual a 0 UFC/100 ml, cumpliendo con lo que exige el

DS N° 031 (**Tablas 13 y 14**), los mismos resultados sostiene Quijada (2015), quien manifiesta que el 100% de las muestras obtenidas después del tratamiento de purificación en las plantas fueron negativas a la presencia de *E.coli*. Sin embargo Zavalaga (2012), declara que para la prueba de *E. coli*, los resultados positivos fueron para 3 de sus 11 marcas evaluadas, indicando una grave deficiencia en la elaboración del producto. Así mismo Vidal et al (2009), Sincelejo-Colombia, mencionan que durante su investigación en una muestra tomada, se obtuvo resultado de  $2.00 \times 10^2$  UFC/100 ml.

Es importante dejar en claro que en la presente investigación, a pesar de no encontrar resultados positivos para el microorganismo en mención, en la mayor parte de casos la membrana de filtración luego del periodo de incubación siempre tuvo carga bacteriana acompañante.

Para evaluar *Pseudomonas aeruginosa*, Delgado & Morales (2015), Managua-Nicaragua, manifiestan en su investigación, que de 10 marcas evaluadas sólo 1 de ellas, en 2 unidades de muestra reportó resultados positivos, y se empleó la técnica de fermentación de tubos múltiples. Así mismo Zavalaga (2012), declara que de las 11 marcas de agua que evaluó, 07 de ellas tuvieron resultados positivos (presencia) en distintos muestreos es decir un 64% del total no cumplieron el requisito. Del mismo modo Benítez B, Ferrer K, Rangel L, Ávila A, Barboza Y, Levi A (2013), Maracaibo-Venezuela, sostienen que de las 10 marcas de agua envasada, 7 (70%), mostraron crecimiento de éste patógeno. En nuestra investigación los resultados obtenidos son parecidos a los citados, en donde 9 de las 10 marcas evaluadas, presentaron presencia de esta bacteria durante los 4 muestreos, cabe señalar que las marcas AE6, AE8 y AE10 tuvieron ausencia en un 75% del total, es decir en 3 de los cuatro muestreos. Solo la marca AE2 cumplió con el requisito de ausencia/100 ml al 100% en los 4 muestreos, tal como lo exige la NTS 071 (**Tabla 15 y Figura 20**).

*Pseudomonas aeruginosa*, puede causar diversos tipos de infecciones pero rara vez causa enfermedades graves en personas sanas sin algún factor predisponente, es un patógeno oportunista y puede colonizar partes dañadas de un individuo como quemaduras, heridas quirúrgicas, aparato respiratorio con patologías crónicas, lesiones en los ojos y en pacientes con fibrosis quísticas, son muy vulnerables a ésta bacteria por su condición (Delgado & Morales, 2015).

La presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en agua envasada, es un indicador de contaminación durante el proceso de envasado, una mala aplicación de las Buenas prácticas de Manufactura (BPM), desinfectantes ineficientes que propician la formación de biopelículas en los sistemas de distribución (tuberías), y en los bidones de distinta capacidad (Delgado & Morales, 2015). Esto pudo corroborarse al momento de realizar los muestreos en donde se evidenciaron algunos bidones con restos de materia orgánica o manchas en sus dispensadores.

Se ha demostrado que *Pseudomonas aeruginosa* es capaz de sobrevivir y multiplicarse en aguas tratadas, esto debido a una densa capa polisacárida la cual forma una barrera no solo física sino química capaz de proteger a la bacteria de iones de cloro libre residual. Estudios realizados a éste patógeno para evaluar la resistencia al cloro libre residual, demuestran que es superior a la de otros microorganismos aislados en el agua (Marchand, 2002).

Para el Recuento de Heterótrofos en Placa (RHP), Benítez et al (2013), sostienen que durante su investigación de 10 marcas de agua envasada, 05 presentan valores que superan los límites establecidos por la norma de calidad, incumpliendo con el requisito. De la misma manera Peña (2017), asegura que de las 10 marcas que seleccionó para su estudio, solo 2 de ellas arrojaron resultados conformes de acuerdo a los límites establecidos en su norma. Igualmente Delgado & Morales (2015), afirman que en su estudio de 10 marcas de agua evaluadas, 4 de éstas sobrepasaron el valor de referencia según su norma, aduciendo una mala aplicación de BPM. De igual modo en esta investigación, de las 10 marcas analizadas, ninguna cumple al 100% (4 muestreos) con los límites establecido por la NTS 071. Es necesario mencionar que la marca AE8, cumplió con el requisito de RHP en 3 de los 4 muestreos (75%), mientras que las marcas AE2 y AE10, solo cumplieron en 2 muestreos (50%) (**Tabla 08 y Figura 12**).

El crecimiento desmedido de heterótrofos en envases plásticos puede estar relacionado al grado de limpieza e integridad del sistema de distribución, es un buen indicador de las condiciones higiénicas de la materia prima, formas de manipulación en el procesamiento, empaque y distribución, entre otros (Benítez et al, 2013)

En ese sentido, los resultados que se obtuvieron de heterótrofos dentro de los 4 muestreos, excedieron considerablemente lo exigido por la NTS 071, se buscó tener un fundamento del

porqué de éstas concentraciones tan exageradas, analizando la interrelación que podría existir entre los microorganismos evaluados, llegando a las siguientes consideraciones:

En el **muestreo 1**, la marca AE9 presentó bacterias coliformes, también coliformes termotolerantes y presencia de *P. aeruginosa*, por lo que se sustenta la elevada concentración de Recuento de Heterótrofos en Placa (RHP).

En el **muestreo 2**, la marca AE5, presentó bacterias coliformes y presencia de *P. aeruginosa*.

En el **muestreo 3**, la marca AE1, registró coliformes y presencia de *P. aeruginosa*, también la marca AE5, presentó elevados recuentos de heterótrofos, fundamentándose en la presencia de *P. aeruginosa*, más no se obtuvo recuentos de bacterias coliformes, finalmente en la marca AE3, el número de heterótrofos fue alto pero no se encontró *Pseudomonas aeruginosa* y los recuentos de bacterias coliformes fueron muy bajos (2 o 3 UFC).

En el **muestreo 4**, la marca AE2 presentó bacterias coliformes y tuvo ausencia de *P. aeruginosa*, la marca AE4 para bacterias coliformes se reportó los resultados más altos, aunque hubo ausencia de *P. aeruginosa*, finalmente la marca AE5 es la que mayor concentración de heterótrofos se registró en toda la investigación con un promedio de 12000 UFC/ml, pero si registró bacterias coliformes y presencia de *P. aeruginosa*.

Por lo tanto existe una marcada relación de la presencia de bacterias coliformes y de *Pseudomonas aeruginosa*, que en la mayoría de casos estimulan o revelan el crecimiento desmedido de éste sensible indicador de calidad (Heterótrofos), el cual es el primero en informar deficiencia, en cualquier proceso de tratamiento de aguas.

Marchand (2002), asegura que *Pseudomonas aeruginosa* tiene capacidad para inhibir coliformes, es decir producen bacteriocinas con acción antibiótica frente a diversos coliformes tales como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* y *Enterobacter agglomerans*. Por lo tanto se corre un gran riesgo de consumir agua con índice de coliformes cero, los cuales podrían estar inhibidos por el género *Pseudomonas*.

Con relación a lo mencionado, en nuestros resultados se evidenció que en el muestreo 1, las marcas AE1 y AE3 presentaron *Pseudomonas aeruginosa* y para bacterias coliformes los resultados fueron 0 o muy pocas UFC/100 ml. En el muestreo 2, sucedió con la marca AE4, en donde se dieron las mismas condiciones, y finalmente en el muestreo 3 se

volvió a repetir para las marcas AE4, AE5 y AE10. Paralelamente, en los 3 muestreos mencionados también se evidenció que hubieron marcas en las que no hubo de recuentos de coliformes, así como ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*, como AE2, AE8 y AE10 (muestreo1), lo mismo sucedió con AE2, AE3 y AE10 (muestreo 2) y en el muestreo 3, con las marcas AE2, AE7 y AE9. Demostrando que no existió un comportamiento inhibitorio de parte de las bacterias coliformes frente a la presencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

La capacidad de adsorción del carbón activado depende de la cantidad que contenga el filtro en relación con el volumen de agua filtrada, del tiempo de contacto, y del periodo de uso. El principal inconveniente que presentan es que cuando ha filtrado grandes cantidades de agua es posible que se saturen de compuestos orgánicos y aunque con menos frecuencia también de microorganismos, por lo que si no se cambian periódicamente pueden ser una fuente de contaminación (Berdonces, 2008).

La oxidación y pérdida de integridad mecánica pueden reducir la eficiencia del tratamiento esto puede desencadenar que aunque las bacterias son mayores que los tamaños típicos de los poros de las membranas, éstas pueden lograr pasar por la existencia de poros anormales o deterioro de la misma membrana (Semino, 2015).

En base a éstos antecedentes, los resultados que se obtuvieron cuando se evaluó el proceso de purificación de agua de la marca AE1, se determinó que a medida que iniciaban las etapas de purificación se obtenían recuentos considerables de microorganismos (RHP, bacterias coliformes y *P.aeruginosa*) y no así cuando se analizó el primer punto de muestreo que fue el tanque de recepción de agua potable; por lo tanto el tratamiento evidenció importantes fallas en los sistemas de filtrado por carbón activado y en la etapa de ósmosis inversa, en consecuencia el proceso de producción no es eficiente para esta empresa (**Tabla 17 y figuras 22 a 24**).

La NTS N° 071-2008, manifiesta que los alimentos y bebidas serán considerados microbiológicamente aptos para el consumo humano, cuando cumplan en toda su extensión con los criterios establecidos en la presente norma sanitaria. A su vez hace referencia a las autoridades como la DIGESA (nivel nacional), DIRESA (nivel regional) y Municipalidades (nivel local), como las entidades responsables de vigilar el cumplimiento de la presente norma.

En el Decreto Supremo N° 031- 2010, **el artículo 9** sostiene que la Dirección General de Salud Ambiental-DIGESA establece la política nacional de calidad de agua, quien tiene como funciones más importantes:

Normar la vigilancia sanitaria del agua para consumo humano

Supervisar el cumplimiento de lo señalado en el presente reglamento, durante los programas de vigilancia.

Otorgar autorización sanitaria a los sistemas de tratamiento de agua para consumo humano.

A nivel regional (DIRESA o DISA), tiene como funciones primordiales las siguientes:

Vigilar la calidad del agua en su jurisdicción.

Elaborar y aprobar los planes operativos anuales de las actividades del programa de vigilancia de la calidad del agua.

Sin embargo, no se evidencia un trabajo riguroso sobre las funciones que le competen para el caso de aguas embotelladas o envasadas, como por ejemplo difundir a la población los resultados que se obtienen de sus operativos, visitas que están enmarcados dentro de su programa de vigilancia.

**En el artículo 21**, del reglamento de agua de consumo, menciona que el autocontrol de la calidad del agua es una responsabilidad del proveedor en base a la reglamentación que le impuso la autoridad sanitaria como el caso de DIRESA.

Sin embargo al no existir un programa riguroso y efectivo de vigilancia se afecta la calidad del agua producida y/o comercializada y genera una situación de vulnerabilidad al sector consumista.



## V. CONCLUSIONES

La calidad bacteriológica del agua embotellada (Bidón de 20 L), que se produce y comercializa en el distrito de Castilla es no aceptable, debido a que no cumple con los estándares de calidad establecidos en la norma técnica sanitaria - NTS 071-2008-Minsa.

De las 10 marcas evaluadas durante los 4 muestreos, ninguna cumplió en toda su extensión con los criterios microbiológicos (agentes microbianos) que establece la NTS 071-2008, que es la norma sanitaria vigente para aguas envasadas.

Se determinó que los factores que probablemente generan la contaminación de estos productos durante el proceso de purificación, se deben a una deficiencia en el mantenimiento preventivo y/o correctivo de los equipos involucrados (membrana de filtrado, membranas de ósmosis inversa, lámparas de luz UV) en el sistema de tratamiento de agua.

En base a la enumeración de bacterias heterotróficas mediante la técnica de vertido, la estimación o concentración de bacterias coliformes, y la detección de *Pseudomonas aeruginosa* usando la técnica de membrana filtrante, se definió la no aceptabilidad del agua embotellada en el distrito de Castilla-Piura, según los valores exigidos por la norma en mención.

## **VI. RECOMENDACIONES**

### **A las empresa productoras**

Implementar y ejecutar programas de mantenimiento preventivo, a todos los equipos involucrados en el proceso de purificación del agua, como también estimar el tiempo de vida útil de cada pieza con el fin de evitar algún riesgo que genere contaminación de su producto terminado.

Aplicar procedimientos eficaces para el manejo de buenas prácticas de manufactura (BPM), del personal que opera ya que son los agentes de transmisión de algún grado de contaminación que se pueda generar.

Así mismo implementar procedimientos y/o instructivos de limpieza y sanitización del área de trabajo que involucren producción, almacén y transporte con el fin de salvaguardar la calidad de sus productos.

Registrar en los envases obligatoriamente información relevante a la calidad de sus productos, como lote de producción, fecha de producción y fecha de vencimiento ya que es importante para un mejor control de su línea de producción.

### **A las autoridades sanitarias**

Exhortar a la DIGESA, que replantee nuevas estrategias de vigilancia y control de todas las empresas que se dedican a éste rubro en las diferentes actividades de producción y/o comercialización, porque hasta el término de esta investigación el número de las mencionadas crece sin prestar las garantías de calidad.

Ejecutar programas de monitoreo programados o inopinados en toda su jurisdicción y difundir los resultados a la población, quienes son los más vulnerables y expuestos, además tienen derecho de pagar por consumir un producto inocuo.

### **A la población**

Revisar que los envases estén en buenas condiciones y que registren lote de producción, así como registro sanitario.

## VII. Referencias Bibliográficas

Alfaro & Rojas. 2006. Validación de los métodos de filtración por membrana y sustrato definido Readycult, para la detección de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas crudas, tratadas y potables en el acueducto de Zipaquirá, en la ciudad de Bogotá, Colombia.

Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis271.pdf>

APHA. 2005. Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales E.E.U.U.

Benítez B, Ferrer K, Rangel L, ÁVILA A, Barboza Y, Levi A. Calidad microbiológica del agua potable envasada en bolsas y botellas que se venden en la ciudad de Maracaibo, estado Zulia-Venezuela. Multiciencias. 2013. Disponible en: <https://www.redalyc.org/html/904/90428348002/>

Berdonces, J. La problemática del tratamiento del agua potable - España REV Medicina naturista. 2008; Vol. 2: 69-75. Disponible en: [file:///C:/Users/ADMIN/Downloads/Dialnet-LaProblematikaDelTratamientoDelAguaPotable-2574510%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/ADMIN/Downloads/Dialnet-LaProblematikaDelTratamientoDelAguaPotable-2574510%20(2).pdf)

Chaidez Q., C. Ph. D. 2002. Agua embotellada y su calidad bacteriológica. Agua Latinoamérica. México.

Delgado, S & Morales, F. 2015. Detección de *Pseudomonas aeruginosa* y bacterias heterótrofas de aguas envasadas en botellas y bolsas destinadas al consumo humano, comercializadas en la ciudad de Managua en el periodo Diciembre 2014 a Enero 2015. Disponible en: <http://repositorio.unan.edu.ni/1029/1/58359.pdf>

DS N° 031- 2010-SA. 2011. Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo Humano, Ministerio de Salud. Dirección de Salud Ambiental – Lima: Ministerio de Salud. Perú

- ISO 9308-1:2014: Water quality- Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria  
–Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background  
flora
- ISO 11133:2014. First edition. Microbiology of food, animal feed and water-  
Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
- ISO 16266: 2006: Water quality – Detection and enumeration of *Pseudomonas  
aeruginosa* – Method by membrane filtration.
- ISO 8199: 2005: Water quality – General guidance on the enumeration of micro-  
organisms by culture.
- León, H & Neira, J. 2013. Control microbiológico en etapas de purificación y producto  
terminado del agua de bidones. Cuenca-Ecuador. Disponible en:  
<http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/4675/1/TESIS.pdf>
- Marchand, E. 2002. Microorganismos indicadores de la calidad del agua de consumo  
humano en Lima Metropolitana - Perú. Disponible en:  
[http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/basic/marchand\\_p\\_e/tesis\\_completo.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/basic/marchand_p_e/tesis_completo.pdf)
- Mejía, M. 2005. Análisis de la calidad del agua para consumo humano y percepción  
local de las tecnologías apropiadas para su desinfección a escala domiciliaria, en  
la microcuenca El Limón, San Jerónimo, Honduras. Disponible en  
<http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A0602e/A0602e.pdf>
- NTP 214.005-1987 (Revisada el 2016): Norma Técnica Peruana – Toma de muestra de  
Agua Potable. Publicada 2016-07-22-INACAL
- NTP 214.042: 2012 CALIDAD DE AGUA. Clasificación de la Matriz agua para  
ensayos de Laboratorio. 1ª Edición. 17 de Enero de 2013.

NTS N° 071 – MINSA/DIGESAV.01 del 27 de agosto del 2008, “Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los alimentos y bebidas de Consumo Humano”. Perú

Norma general para las aguas potables Embotelladas/ Envasadas (Distintas de las aguas minerales naturales) Disponible en <http://www.codexalimentarius.net/>

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 2006. Guías para la Calidad del Agua Potable. Primer apéndice a la tercera edición, volumen 1. Ediciones de la OMS.

Peña, M. 2017. Análisis microbiológico de Aerobios en aguas embotelladas expendidas bajo normas de calidad. Machala -Ecuador. Disponible en: <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/11165/1/PE%C3%91A%20OTACOMA%20MANUEL%20ENRIQUE.pdf>

Quijada, R. 2015. Caracterización bacteriológica del agua embotellada comercializada en zona centro-oriental de Zamorano-Honduras. Disponible en: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/4520/1/IAD-2015-028.pdf>

Rojas, A. 2003 - Técnicas Estadísticas Paramétricas y no Paramétricas equivalentes: Resultados comparativos por simulación. Ecuador. Disponible en: <http://www.iuma.ulpgc.es/~nunez/mastertecnologiatelecomunicacion/RecursosGenerales/TesisEstadisticaParametricayNoParametrica.pdf>.

Semino, F. 2015. Producción de agua de mesa por ósmosis inversa para autoabastecimiento de UDEP. Piura – Perú. Disponible en: [https://pirhua.udep.edu.pe/bitstream/handle/11042/2238/ING\\_550.pdf;sequence=1](https://pirhua.udep.edu.pe/bitstream/handle/11042/2238/ING_550.pdf;sequence=1)

Senior, Dorothy A.G.; P.R., ASHURST. 2001. Tecnología del Agua Embotellada. De la edición en lengua española. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza-España.

SMEWW-APHA-AWWA-WEF Part 9215 B, 23rd Ed. 2017. Heterotrophic Plate Count. Pour Plate Method.

SMEWW-APHA-AWWA-WEF Part 9222 D, 23rd Ed. 2017. Membrane Filter Technique for Members of the Coliform Group. Thermotolerant (Fecal) Coliform Membrane Filter Procedure.


Vidal J, Consuegra A, Gomescaseres L, Marrugo J. Evaluación de calidad microbiológica del agua envasada en bolsas producida en Sincelejo – Colombia REV MVZ Córdoba. 2009; 14 (2): 1736-44. Disponible en: [file:///C:/Users/ADMIN/Downloads/Dialnet-EvaluacionDeLaCalidadMicrobiologicaDelAguaEnvasada-3232216%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/ADMIN/Downloads/Dialnet-EvaluacionDeLaCalidadMicrobiologicaDelAguaEnvasada-3232216%20(1).pdf)

Zavalaga, E. 2012. Calidad Microbiológica y Fisicoquímica del agua Embotellada, Comercializada en la Ciudad de Tacna- Perú. Disponible en: [http://repositorio.unjbg.edu.pe/bitstream/handle/UNJBG/1896/29\\_2012\\_zavalaga\\_talledo\\_en\\_faci\\_biologia\\_microbiologia.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unjbg.edu.pe/bitstream/handle/UNJBG/1896/29_2012_zavalaga_talledo_en_faci_biologia_microbiologia.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Zhen, B. 2009. Calidad físico-química y bacteriológica del agua para consumo humano de la microcuenca de la quebrada Victoria, Curubandé, Guanacaste - Costa Rica, año hidrológico 2007-2008. Disponible en: <https://www.aya.go.cr/centroDocumetacion/catalogoGeneral/Calidad%20f%C3%ADsicoqu%C3%ADmica%20y%20bateriol%C3%B3gica%20del%20agua%20para%20consumo%20humano%20de%20la%20microcuenca.pdf>

## ANEXOS

**I.- NTS N° 071-MINSA/DIGESA** “Norma Sanitaria Que Establece Los Criterios Microbiológicos De Calidad Sanitaria e Inocuidad Para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano” – **RM N°591-2008-MINSA**

NTS N° 071 - MINSA/DIGESA-V.01 NORMA SANITARIA QUE ESTABLECE LOS CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE CALIDAD SANITARIA E INOCUIDAD PARA LOS ALIMENTOS Y BEBIDAS DE CONSUMO HUMANO						
 HERNANDEZ C	<b>XVI.3 Aguas envasadas carbonatadas (*) y no carbonatadas.</b>					
	Agente microbiano	Categoría	Clases	n	c	Limite por mL
						m      M
	Bacterias heterotróficas	2	3	5	2	10      100
	Coliformes	5	2	5	0	< 1,1 /100 mL      -----
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	2	5	0	Ausencia /100 mL      -----
(*) Los análisis se efectuarán solo para el caso de aquellas con pH > 3,5						

**II.-** Reglamento de la calidad de Agua para consumo Humano: D.S. N° 031- 2010-SA/ Ministerio de Salud. Dirección General de Salud Ambiental – Lima: Ministerio de Salud; 2011

**ANEXO I**

**LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES DE PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS Y PARASITOLÓGICOS**

Parámetros	Unidad de medida	Límite máximo permisible
1. Bacterias Coliformes Totales.	UFC/100 mL a 35°C	0 (*)
2. E. Coli	UFC/100 mL a 44,5°C	0 (*)
3. Bacterias Coliformes Termotolerantes o Fecales.	UFC/100 mL a 44,5°C	0 (*)
4. Bacterias Heterotróficas	UFC/mL a 35°C	500
5. Huevos y larvas de Helmintos, quistes y ooquistes de protozoarios patógenos.	N° org/L	0
6. Virus	UFC / mL	0
7. Organismos de vida libre, como algas, protozoarios, copépodos, rotíferos, nemátodos en todos sus estadios evolutivos	N° org/L	0

UFC = Unidad formadora de colonias

(\*) En caso de analizar por la técnica del NMP por tubos múltiples = < 1,8 /100 ml



**III.- Relación de Empresas Procesadoras de Agua Envasadas, con sus respectivas marcas – DIRESA 2016- PIURA.**

<b>RAZON SOCIAL</b>	<b>MARCA</b>
LIDRES DEL NORTE S.C.R.L	AGUA SPRING
JAIME CALDERO PAUCAR	AGUA DE MESA VITAL
SAGITARIO E.I.R.L	AGUA OASIS
HIDROLAM PIURA S.R.L	AGUA DE MESA SELEC LIFE
MENDOZA RODRIGUEZ CARLOS ENRIQUE	AGUA DE MESA ECOAGUA
NEGOCIOS Y SERVICIOS RAYPA E.I.R.L	AGUA RAYPA
AGUA DE MESA ACQUASANA	AGUA DE MESA ACQUASANA
X-TRAGOS H2O E.I.R.L	AGUA DE MESA CAMILLE
AGUA SANTA CLARA	AGUA SANTA CLARA
AQUASU S.R.L	AGUA AQUASU
DILAVI DISTRIBUCIONES GENERALES S.R.L	AGUA FUENTE
HIDRONOR E.I.R.L	AGUA SANTA MARINA
SANTA ROSA ELENA E.I.R.L	AGUA EL POLO
INDUSTRIAS RAMOS PERU S.A.C	AGUA FONTANA
COMERCIALIZADORA SAN MIGUEL E.I.R.L	AQUAVITA
INDUSTRIAS PUQUIO E.I.R.L	AGUA DE MESA PUQUIO
INVERSIONES ROSITA E.I.R.L	AGUA SANTA ROSITA
EMPRESA MATHEW S.R.L	AGUA OZONIZADA MATHEW
AGUA WANKA YACU	AGUA WANKA YACU
ROGUIN S.A	AGUA DE MESA AQUA PLUS
INVERSIONES A & C ASOCIADOS	AGUA SANTA SOFIA
AGUA DE MESA SAN MIGUEL	AGUA DE MESA SAN MIGUEL
EDWARDTEK E.I.R.L	AGUA PURISSIMA
DISTRIBUIDORA CAGUBA S.A.C	AGUA DE MESA AQUALIGHT
H2O RIO VITA	AGUA H2O RIO VITA
VILCHEZ URIBE EDWIN WILLIAM	AGUA PURA
ASLU INVERSIONES GENERALES S.R.L	AGUA DE MESA ASLU
GRUPO VIZA	AGUA DE MESA HEIKE
AGUA FRESH	AGUA FRESH
AGUA DEL PILAR	AGUA DE MESA PILAR
CNC S.A.C	AGUA SAN ANDRES
FRANKE RODRIGUEZ, JERRY KENNETH	AGUA DE MESA CRISTALIGHT
PUBLI UNIVERSAL E.I.R.L	AGUA DE MESA DEL OLIMPO
AGROINDUSTRIAS MALAKASI EXPORT S.A.C	AGUA DE MESA AQUA FENIX
AGUA DE MESA SAN MARTIN	AGUA DE MESA SAN MARTIN
INGENIERIA DEL AGUA S.A.C	AGUA DE MESA SAN DIEGO
PROYECTOS INTEGRALES LOGISTICOS E.I.R.L	AGUA DE MESA SALUD (DULCE)
ROSEND S.A	AGUA DE MESA BARUO

<b>AGUA NATURAL A &amp; V E.I.R.L</b>	<b>AGUA DE MESA A&amp;V</b>
<b>PLANTA Y EMBOTELLADORA LA SOBERANA E.I.R.L</b>	<b>AGUA DE MESA LA SOBERANA</b>
<b>FRIO DEL NORTE –FRINOR S.A.C</b>	<b>AGUA DE MESA PREMIUM</b>
<b>PIUR SOCIEDAD ANONIMA CERRADA</b>	<b>AGUA OZONIZADA PIUR</b>
<b>KEISY &amp; PAULA E.I.R.L</b>	<b>AGUA DE MESA DIVINA</b>
<b>FRIO DEL NORTE –FRINOR S.A.C</b>	<b>AGUA DE MESA ECOPREMIUM</b>
<b>CIA EMBOTELLADORA ACQUALINE E.I.R.L</b>	<b>AGUA DE MESA YAQUBLU</b>
<b>ROMA SERVIS S .A.C</b>	<b>AGUA DE MESA AUITA</b>
<b>ALIMENTOS PERUANOS MVC</b>	<b>AGUA DE MESA Q'DRINK</b>
<b>DISTRIBUIDORA ALASKA E.I.R.L</b>	<b>AGUA ALASKA</b>
<b>INGENIERIA &amp; OSEVAN E.I.R.L</b>	<b>AGUA DE MESA AQUAFAS</b>

**FUENTE: DIRESA- PIURA, 2016/ OFICIO N° 032.**

#### IV.- NTP 214.042, 2012 - CALIDAD DE AGUA. Clasificación de matriz agua para laboratorio

<b>NORMA TÉCNICA</b>	<b>NTP 214.042</b>
<b>PERUANA</b>	<b>2012</b>
Comisión de Normalización y de Fiscalización de Barreras Comerciales no Arancelarias - INDECOPI Calle De la Prosa 104, San Borja (Lima 41) Apartado 145	
Lima, Perú	

**CALIDAD DE AGUA. Clasificación de la matriz agua para ensayos de laboratorio**

WATER QUALITY. Water matrix classification for laboratory tests

**2012-12-28**  
**1ª Edición**

#### 4.3 Agua para uso y consumo humano

Aquellas aguas que cumplen con los requisitos fisicoquímicos y biológicos para uso y consumo humano.

4.3.1 **Agua de bebida (Agua potable / Agua de Mesa / Agua Envasada):** Agua que puede ser consumida debido a que no representa un riesgo para la salud.

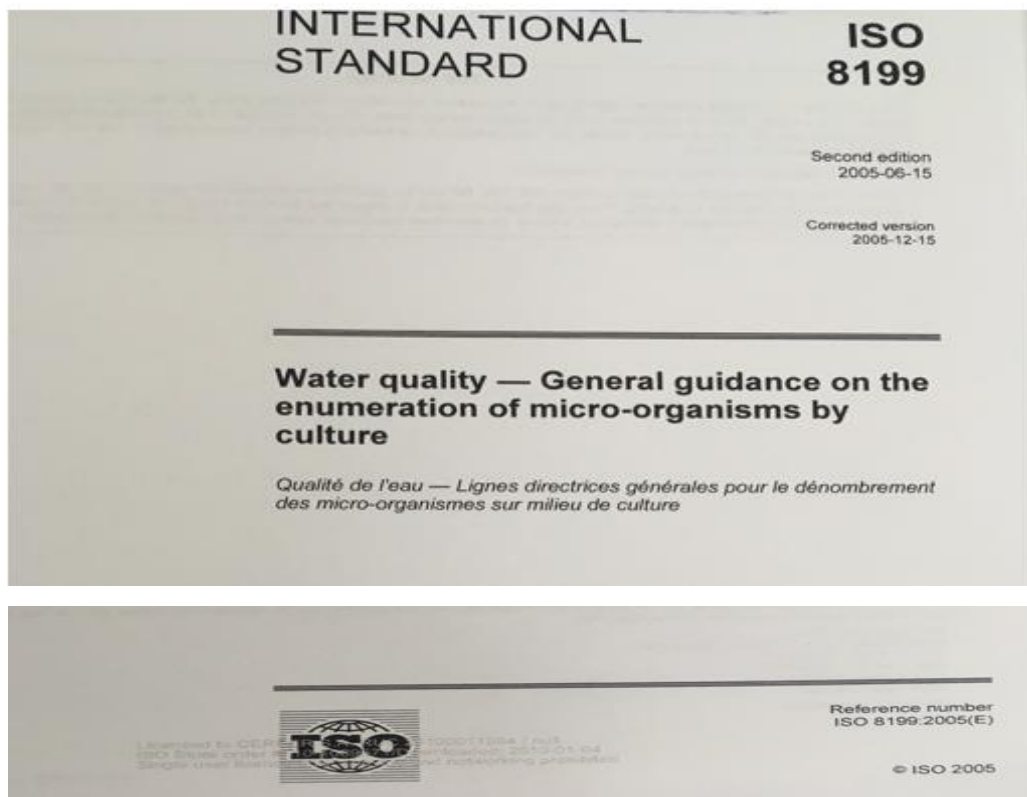
4.3.2 **Agua de piscina:** Agua que para ser apta para el uso humano debe ser sometida a diferentes tratamientos con la finalidad de evitar la presencia de bacterias, virus, hongos entre otros.

4.3.3 **Agua de laguna artificial:** Es el agua empleada para uso recreativo

---

<sup>1</sup> Afluente: fluido que ingresa a un proceso de tratamiento.  
Efluente: fluido liberado desde un foco emisor.

## V. - ISO 8199: 2005 – Water quality- General guidance on the enumeration of micro-organism by culture



### ISO 8199:2005(E)

a very different ratio to that of the dilution factor between the plates of two successive dilutions), and it is therefore necessary that results obtained from counting be examined, interpreted or even refused by a qualified microbiologist.

#### 8.4.2 General case

The calculation of results given in this subclause can be used in cases when the total number of colonies on the plates is between 10 and 200 (spread plate and membrane filtration techniques) or between 10 and 300 (pour plate technique), and where the number of typical colonies is between 10 and 150 (spread plate and pour plate techniques) or between 10 and 100 (membrane filtration technique).

Since each colony is assumed to have arisen from one micro-organism or from a single aggregate of micro-organisms, the result is expressed as the number of colony-forming units (cfu) or colony-forming particles (cfp) in a specified reference volume of the sample (generally 100 ml or 1 ml) by Equation (1):

$$C_s = \frac{Z}{V_{\text{tot}}} \times V_s \quad (1)$$

where

$C_s$  is the estimate of the number of cfu or cfp in the reference volume  $V_s$  of the sample;

$Z$  is the sum of colonies counted on plates or on membranes derived from dilutions  $d_1, d_2, \dots, d_p$  or derived from separate volumes of the test portion (sample or dilution);

$V_s$  is the reference volume chosen to express the concentration of the micro-organisms in the sample;

$V_{\text{tot}}$  is the calculated total volume of original sample included in the plates enumerated.

## VI. – SMEWW-APHA Part 9215B, 23nd Ed. 2017- Heterotrophic Plate Count.

### 9215 B. Pour Plate Method

#### 1. Samples and Sample Preparation

See 9215A.4 and 5.

#### 2. Sample Dilution

Prepare water used for dilution blanks as directed in Section 9050C.1.

*a. Selecting dilutions:* If possible (e.g., based on historical information), select dilutions so at least one plate in a series will contain 30 to 300 CFU (Figure 9215:1). For example, if experience indicates that heterotrophic plate counts can be as high as 3000 CFU, prepare plates at  $10^{-1}$  and  $10^{-2}$  dilutions.

For most potable water samples, plating 1 mL and 0.1 mL undiluted sample and 1 mL of the  $10^{-2}$  dilution will produce plates suitable for counting.

*b. Measuring sample portions:* Do not prepare dilutions and pour plates in direct sunlight. Use a sterile pipet for all transfers from each container; one pipet per dilution. If any pipet becomes contaminated before transfers are completed, replace it with a sterile one. Use caution when removing sterile pipets from the container; to avoid contamination, do not drag pipet tip across exposed ends of pipets in the pipet container or across lips and necks of dilution bottles. When removing sample, do not insert pipet  $>2$  to 3 cm below the surface of sample or dilution.

*c. Measuring dilutions:* Add sample to a sterile Petri dish before adding melted, tempered culture medium. When discharging sam-

ple portions, hold pipet or micropipet tip at an angle of about  $45^\circ$ , with tip touching bottom of Petri dish or inside neck of dilution bottle. Lift Petri-dish cover just high enough to insert pipet or micropipet tip. Allow 2 to 4 s for liquid to drain from 1-mL graduation mark to pipet tip. When measuring 0.1-mL quantities, let diluted sample drain from chosen reference graduation until 0.1 mL has been delivered. Use decimal dilutions when preparing sample volumes  $<0.1$  mL. When examining sewage or turbid water, do not measure a 0.1-mL inoculum of original sample; instead, prepare an appropriate dilution (9215A.5).

If pipet is not a blow-out type, touch tip of pipet *once* against a dry spot on Petri dish bottom. If using a cotton-plugged blow-out type pipet and a pipet bulb (less preferable), gently blow out remaining volume of sample dilution. Remove pipet without further touching it to dish.

After depositing test portions for each series of plates, pour culture medium and mix carefully. Do not let  $>20$  min elapse between starting pipeting and pouring plates.

#### 3. Media for Plating

*a. Melting medium:* Melt sterile solid agar medium in boiling water, via exposure to flowing steam in a partially closed container, or via microwave [Section 9020B.5(3)]. Avoid prolonged exposure to unnecessarily high temperatures during and after melting. Do not re-sterilize plating medium. If medium is melted in two or more

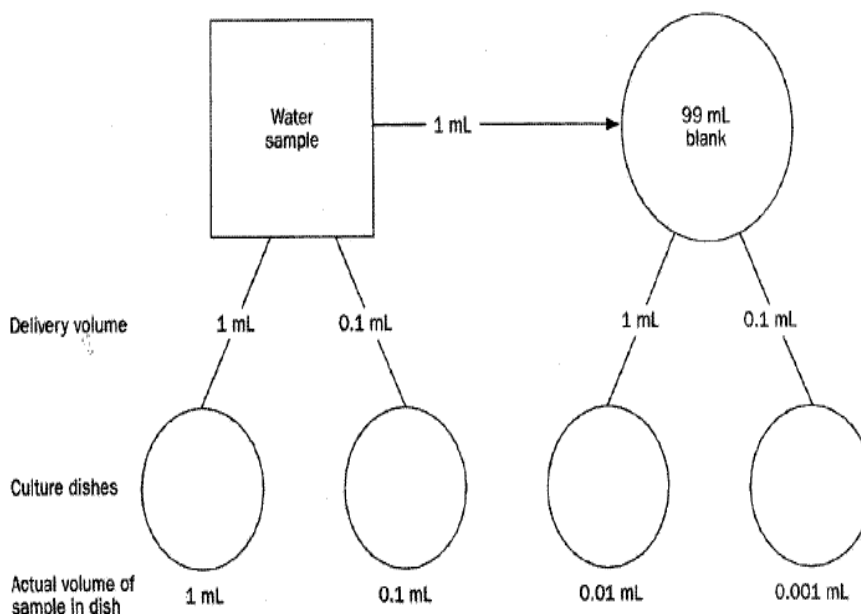


Figure 9215:1. Preparation of dilutions.

VII. – ISO 9308-1: 2014 - Water quality-Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. Third Edition.

# INTERNATIONAL STANDARD

**ISO  
9308-1**

Third edition  
2014-09-15

## Water quality — Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria —

### Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora

Contents	Page
Foreword	iv
Introduction	v
1 Scope	1
2 Normative references	1
3 Terms and definitions	1
4 Principle	2
5 Apparatus and glassware	2
6 Culture media and reagents	2
7 Sampling	3
8 Procedure	3
8.1 Preparation of the sample	3
8.2 Filtration	3
8.3 Incubation and differentiation	3
9 Expression of results	4
10 Test report	4
11 Quality assurance	4
11.1 General	4
11.2 Performance testing of Chromogenic Coliform Agar (CCA)	4
11.3 Performance testing of oxidase test	5
Annex A (informative) Further microbiological information on coliform bacteria	6
Annex B (normative) Composition and preparation of culture media and reagents	7



# VIII. – SMEWW-APHA Part 9222D, 23rd Ed. 2017- Membrane Filter. Thermotolerant (Fecal)

## 9222 D. Thermotolerant (Fecal) Coliform Membrane Filter Procedure

Thermotolerant (formerly *fecal*) coliform bacterial densities may be determined by either multiple-tube procedure or MF technique. (See Section 9225 for differentiation of *Escherichia coli*.) The thermotolerant coliform MF procedure uses an enriched lactose medium and incubation temperature of  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$  for selectivity. Because incubation temperature is critical, submerge waterproofed (plastic bag enclosures) MF cultures in a water bath for incubation at the elevated temperature or use an appropriate solid heat-sink or other incubator that is documented to hold the temperature at  $44.5^\circ\text{C} \pm 0.2^\circ\text{C}$  throughout the chamber over a 24-h period. The best type of incubator is a gable-covered circulating water bath. In general, this method is applicable under the same circumstances as the multiple-tube thermotolerant coliform procedures (see Section 9221E).

There are limitations to the interpretation of a thermotolerant coliform result from thermal waters (e.g., the tropics) and pulp and paper mill effluent samples where thermotolerant *Klebsiella* have predominated and not been indicative of a sewerage source. As with all coliform results, a sanitary survey should be conducted to identify the most plausible source and public health risk interpretation.

### 1. Laboratory Apparatus

- a. *Sample bottles:* See Section 9030B.19.
- b. *Dilution bottles:* See Section 9030B.13.
- c. *Pipets and graduated cylinders:* See Section 9030B.9.
- d. *Containers for culture medium:* See 9222B.1d.

e. *Culture dishes:* Tight-fitting plastic dishes (see 9222B.1e) are preferred when MF culture plates will be submerged in a water bath during incubation. Place thermotolerant coliform culture plates in plastic bags (remove as much air as possible) or seal individual dishes with waterproof (freezer) tape to prevent leakage during submersion.

f. *Filtration units:* See 9222B.1f.

g. *Membrane filters:* See 9222B.1g.

h. *Absorbent pads:* See 9222B.1h.

i. *Forceps:* See 9222B.1i.

j. *Water bath or incubator:* The specificity of the thermotolerant coliform test is related directly to incubation temperature. To meet the need for greater temperature control, use a gable-covered water bath, a heat-sink incubator, or any properly designed and constructed incubator that can maintain a temperature tolerance of  $\pm 0.2^\circ\text{C}$ . Most circulating water baths equipped with a gable top to reduce water and heat loss can maintain a temperature of  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ . However, static air incubation may be a problem in some types of incubators because of potential heat layering in the chamber, slower heat transfer from air to the medium, and slow temperature recovery each time the incubator is opened during daily operations.

### 2. Materials and Culture Medium

*mFC medium:* The need for uniformity dictates the use of dehydrated media. Never prepare media from basic ingredients when suitable dehydrated media are available. Follow the manufacturer's directions for rehydration. Commercial liquid media

<https://doi.org/10.2105/SMEWW.2882.193>

9

## MEMBRANE FILTER TECHNIQUE (9222)/Thermotolerant (Fecal) Coliform Membrane Filter Procedure

(sterile ampule, etc.) may be used if known to give equivalent results. See Section 9020 for QC specifications. If commercially prepared medium is unavailable, prepare from individual components as described below.

*mFC medium:*

Tryptose or biosate.....	10.0 g
Proteose peptone No. 3 or polypeptone .....	5.0 g
Yeast extract.....	3.0 g
Sodium chloride (NaCl).....	5.0 g
Lactose.....	12.5 g
Bile salts No. 3 or bile salts mixture.....	1.5 g
Aniline blue.....	0.1 g
Agar (optional).....	15.0 g
Reagent-grade water.....	1 L

Rehydrate product or individual components in 1 L water containing 10 mL 1% rosolic acid in 0.2N NaOH.\* Heat to near boiling, promptly remove from heat, and cool to  $<50^\circ\text{C}$ . Do not sterilize by autoclaving. If agar is used, dispense 4- to 6-mL quantities to 9- × 50-mm Petri plates (approximately 4 to 5 mm deep) and let solidify. Final pH should be  $7.4 \pm 0.2$ . Refrigerate finished medium (preferably in sealed plastic bags or other containers to reduce moisture loss) and discard unused broth after 96 h or unused agar after 2 weeks. NOTE: For samples from sources known to have minimal background growth (e.g., drinking water), 1% rosolic acid addition can be omitted from mFC medium, but it should be used for all unknown sources, stormwaters, and ambient water sources.

Before use, test each batch of laboratory-prepared MF medium for performance with positive and negative culture controls (See Table 9020:VI). Check for coliform contamination at the beginning and end of each filtration series by filtering 20 to 30 mL of

TABLE 9222:IV. SUGGESTED SAMPLE VOLUMES FOR MEMBRANE FILTER THERMOTOLERANT COLIFORM OR *E. COLI* TEST

Water Source	Volume (X) To Be Filtered mL							
	100	50	10	1	0.1	0.01	0.001	0.0001
Drinking water	X							
Lakes, reservoirs	X	X						
Wells, springs	X	X						
Water supply intake		X	X	X				
Natural bathing waters		X	X	X				
Sewage treatment plant			X	X	X			
Farm ponds, rivers				X	X	X		
Stormwater runoff				X	X	X		
Raw municipal sewage					X	X	X	
Feedlot runoff					X	X	X	
Sewage sludge						X	X	X

pad. Carefully remove any excess liquid from culture dish by decanting plate. After filtration, aseptically place sample filter on medium-impregnated pad [see 9222B.2b2)].

As a substrate substitution for the nutrient-saturated absorbent pad, add 1.5% agar to mFC broth [see 9222B.2b1)].

d. *Incubate:* Place prepared dishes in waterproof plastic bags, remove as much air as possible, seal, invert, and submerge Petri dishes in water bath; incubate for  $24 \pm 2$  h at  $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ . Anchor dishes below water surface; if anchor devices (e.g., "O" rings, bricks, or water bottles) will also be submerged, make sure they are prewarmed before sample use, small enough to maintain critical temperature requirements, and do not interfere with sample incubation. Place all prepared cultures in water bath with

IX. - ISO 16266: 2006. First edition. Water quality – Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*

INTERNATIONAL  
STANDARD

ISO  
16266



First edition  
2006-04-15

**Water quality — Detection and  
enumeration of *Pseudomonas  
aeruginosa* — Method by membrane  
filtration**

*Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement de Pseudomonas  
aeruginosa — Méthode par filtration sur membrane*

**Contents**

Page

Foreword.....	iv
Introduction .....	v
1 Scope .....	1
2 Normative references .....	1
3 Terms and definitions.....	2
4 Principle.....	2
5 Diluents, culture media and reagents.....	2
6 Apparatus and glassware .....	5
7 Sampling .....	5
8 Procedure .....	6
9 Expression of results .....	7
10 Test report .....	8
11 Performance data.....	8
12 Interferences .....	9
13 Quality assurance .....	9
Annex A (informative) Further information about <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	10
Annex B (informative) Alternative media .....	11
Bibliography .....	12



**X.- HOJA DE REPORTE PARA RECuento DE HETERÓTROFOS EN PLACA**

ANÁLISIS DE AGUAS - Colimetría NMP																									O/S:									
																									Nº DE LAB.									
																									AE1									
Fecha de inicio : 2018-06-19					Hora : 17:30					Fecha de término : 2018-06-21																								
Resultado					Cód. SIGEL					AE1					AE1					AE1														
Diluyente: Agua peptonada,					CED: UFC/100mL 0					Controles					N1					N2					N3									
Medio. Lote. Fecha de lectura					Incubación					- + CEM					10 1 -1 -2 -3 -4 -5 -6 -7 -8					10 1 -1 -2 -3 -4 -5 -6 -7 -8					10 1 -1 -2 -3 -4 -5									
C. Lauri					35°C ± 0.5°C/24 ± 2h																													
Lt. F.L.					35°C ± 0.5°C/48 ± 3h																													
C. Brilla Lt. F.L.					35°C ± 0.5°C/48 ± 3h																													
Probabilidad																																		
(1) Coliformes totales:																																		
NMP/100																																		
A. Plate Count. Lt. F.L. 2018-06-21					35°C ± 0.5°C/48h					No Aplica					269 21					249 22					271 24									
Controles: Agar ( 0 ) Ambiental ( 0 )															263 24					261 18					258 22									
(4) Recuento de heterótrofos en placa:										270					UFC/mL					260					UFC/mL					260				
Control de Duplicados o paralelos										D²					0.0677					0.2824					0.3195									
Control de Diluciones consecutivas										d²					1.1653					2.2000					0.8280									
Incertidumbre										R±					---					---					---									
Observaciones: CED: Control de esterilidad del diluyente, filtrar 100 ml, colocar en agar Pc e incubar a 35±0.5°C/48h																																		
Incubadora: (35 ± 0.5°C)					Baño de agua (44.5 ± 0.2°C):					Vortex					Microscopio:					Lámpara U.V.:														
					Baño de agua (45 ± 1°C):					Equipo de Filtración					Membrana:					Contador de colonias:														

**XI.- HOJA DE REPORTE PARA BACTERIAS COLIFORMES Y *Escherichia coli***

FECHA DE INICIO:	17/09/2018	18:30									
FECHA DE TERMINO :	19/09/2018										
					AE9		AE9		AE9		
					N1		N2		N3		
Diluyente: A.P 0.1% Lt.	Volumen filtrado:	Control			100 ml	250 ml	100 ml	250 ml	100 ml	250 ml	
Medio de cultivo	Incubación	Blanc	-	+							
Chromocult coliform agar (β-D galactosidasa)	36 ± 2°C	21 a 24 h	0	-	+	10	21	13	30	8	18
β-D glucuronidase	F.L. 2018-09-18										
Tryptone Soy Agar	36 ± 2°C		-	+	10	10	10	10	8	10	
Lt.	F.L. 2018-09-19	21 ± 3h									
Oxidasa <sup>a,b</sup> (-) Lt.	F.L. 2018-09-19	30 s	-	+	10/10	10/10	10/10	10/10	8/8	10/10	
Coliformes UFC / 100, 250 mL					1.0 x 10	2.1 x 10	1.3 x 10	3.0 x 10	8 B	1.8 x 10	
Incertidumbre			R ±								
Chromocult coliform agar (β-D glucuronidase)	36 ± 2°C	21 a 24 h	0	-	+	0		0		0	
Lt.	F.L. 2018-09-18										
Agar TBX (β-glucuronidasa)	44 ± 1°C	21 a 24 h	0	-	+	0		0		0	
Lt.	F.L. 2018-09-18										
E. coli UFC/ 100 mL						<1 B	<1 B	<1 B	<1 B	<1 B	
Intervalos de Confianza al 95%:	Lim. Sup.:		1.8 x 10	3.0 x 10	4	2.3 x 10	4.1 x 10	4	16	2.9 x 10	4
	Lim Inf.:		5	1.2 x 10	0	8	1.9 x 10	0	4	1.1 x 10	0
			100 ml	250 ml	100 ml	100 ml	250 ml	100 ml	100 ml	250 ml	100 ml
OBSERVACIONES:			Bacterias coliformes	E.coli	Bacterias coliformes	E.coli	Bacterias coliformes	E.coli	Bacterias coliformes	E.coli	
En todas las placas se observó carga acompañante											

## XII.- HOJA DE REPORTE PARA COLIFORMES TERMOTOLERANTES

FECHA DE INICIO:		2018-06-20		HORA:		18:45:00	
FECHA DE TÉRMINO:		2018-06-23					
Diluyente: AP 0.1% <sup>**</sup> Lt.:	CED UFC/100mL	0	CONTROL IN LAB.		AE9		AE9
					N1		N2
					N3		
Medio / N Lote - Fecha de lectura	TEMP °C	TIEMPO	-	+	CEM	Vol.:	100 ml
Agar M-FC	44.5±0.2°C	24 ± 2 h	-	+	-	Memb. Filtr. 0	4
F.L. 2018-06-21						U. Filtración 0	2
Caldo Lauril Triptosa (verificación)	35±0.5°C	48 ± 3 h	-	+	-		4/4
F.L. 2018-06-23							2/2
Caldo EC	44.5±0.2°C	24 ± 2 h	-	+	-		4/4
F.L. 2018-06-22							2/2
2. COLIFORMES TERMOTOLERANTES UFC/100mL					4		2
Límite de confianza al 95%			L. Superior		10.2		7.2
			L. Inferior		1.0		0.2
							< 1
							0
			Observaciones:				
*Coliformes Fecales Verificado			/				
CED: Control de esterilidad de diluyente, filtrar 100 mL, colocar en agar PC e incubar 35'±0.5' C x 48h							
CEM: Control de esterilidad de medios de cultivo, incubar el medio sin inocular.							
CEPAS CONTROL:		(+)-ML 24 : <i>E. coli</i>		(-)-ML 20 : <i>E. aerogenes</i>			
** Solo se utiliza para dispersión de las colonias							
EQUIPOS:		Contador de colonias:					
Equipo de Filtración		Membrana		Coliformes Fecales: Baño de Agua			

### **XIII.- COMPOSICIÓN, CARACTERÍSTICAS Y ALMACENAMIENTO DE MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS – SEGÚN MÉTODOS EMPLEADOS**

#### **A.1 Agar coliforme cromogénico (CCA)**

Digestivo enzimático de caseína	1,0 g
Extracto de levadura	2,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Fosfato dihidrógeno de sodio x 2 H <sub>2</sub> O	2,2 g
Fosfato de hidrógeno disodio	2,7 g
Piruvato de sodio	1,0 g
Sorbitol	1,0 g
Triptófano	1,0 g
Surfactante etiloxilato de alcohol	0,15 g
6-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosida (Salmon-beta-D-galactosid)	0,2 g
Ácido 5-Bromo-4-cloro-3 indoxil-β-D-glucorónido, monohidratado-ciclohexilamonio (x-beta-G. glucorónida)	0,1 g
Isopropilo- β-D-tiogalactopiranosida	0,1 g
Agar	9 g a 18 g
Agua de grado reactivo	1000ml
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Tipo de esterilización: baño María - No autoclavar, ni sobrecalentar</li> <li>➤ Ajuste de PH (25°C) = 6,8 ± 0,2</li> <li>➤ Temperatura de almacenamiento: (5 ± 3) °C / en oscuridad y protegidos de la evaporación</li> <li>➤ Tiempo de almacenamiento: mínimo 1 mes</li> </ul>	

#### **A.2 Caldo Oxidasa**

N,N,N,N-Tetrametil-p-fenilenediamina dihidrocloruro	0,1 g
Agua de grado	10 ml

### A.3 Agar Triptona bilis glucorónido (TBX)

Digestivo enzimático de caseína	20,0 g
Sales biliares N° 3	1,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
5-bromo-4 cloro-3-indolil β-d-ácido glucorónido (BCIG)	144 μmol
Dimetil sulfóxido (DMSO)	3 ml
Agar	9 g a 18 g
Agua de grado reactivo	1000 ml
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Tipo de esterilización: Autoclave 121°C por 15 min</li><li>➤ Ajuste de PH (25°C) = <math>7,2 \pm 0,2</math></li><li>➤ Temperatura de almacenamiento: <math>(5 \pm 3) ^\circ\text{C}</math> / en oscuridad y protegidos de la evaporación</li><li>➤ Tiempo de almacenamiento: Hasta 4 semanas</li></ul>	

### A.4 Triptona soya agar (TSA)

Triptona	15,0 g
Peptona de soya	5,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agar	15 g a 25 g
Agua de grado	1000 ml
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Tipo de esterilización: Autoclave <math>(121 \pm 3) ^\circ\text{C}</math> por 15 min</li><li>➤ Ajuste de PH (25°C) = <math>7,2 \pm 0,1</math></li><li>➤ Temperatura de almacenamiento: <math>(5 \pm 3) ^\circ\text{C}</math> / en oscuridad y protegidos de la evaporación</li><li>➤ Tiempo de almacenamiento: mínimo 1 mes</li></ul>	

### A.5 Agar mFC- medium

Triptosa	10,0 g
Proteasa Peptone N° 3	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Cloruro de sodio, NaCl	5,0 g
Lactosa	12,5 g
Sales biliares N° 3 o mezcla de sales biliares	1.5 g
Azul de anilina	0,1 g
Agar (opcional)	15,0 g
Agua de grado	1000 ml
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Tipo de esterilización: baño María - No autoclavar, ni sobrecalentar</li><li>➤ Ajuste de PH (25°C) = <math>7,4 \pm 0,2</math></li><li>➤ Temperatura de almacenamiento: <math>(5 \pm 3) ^\circ\text{C}</math> / en oscuridad y protegidos de la evaporación</li><li>➤ Tiempo de almacenamiento: mínimo 1 mes</li></ul>	

### A.6 Caldo Lauril Triptosa

Triptosa	20,0 g
Lactosa	5,0 g
Fosfato de hidrógeno di potásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	2,75 g
Fosfato di hidrogenado de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	2,75 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5,0 g
Lauril sulfato de sodio	0,1 g
Agua de grado reactivo	1000 ml
Dispensar el medio de cultivo líquido en tubos de ensayo y agregar un vial invertido.	
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Tipo de esterilización: Autoclave (121°C por 15 min)</li><li>➤ Ajuste de PH (25°C) = <math>6,8 \pm 0,2</math></li><li>➤ Temperatura de almacenamiento: <math>(5 \pm 3) ^\circ\text{C}</math> / en oscuridad y protegidos de la evaporación</li><li>➤ Tiempo de almacenamiento: mínimo 1 mes</li></ul>	

### A.7 Caldo EC-Medium

Triptosa o tripticasa	20,0 g
Lactosa	5,0 g
Mezcla de sales biliares o sales biliares N° 3	1,5 g
Fosfato de hidrógeno di potásico ( $K_2HPO_4$ )	4,0 g
Fosfato di hidrogenado de potasio ( $KH_2PO_4$ )	1,5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5,0 g
Agua de grado reactivo	1000 ml
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Tipo de esterilización: baño María - No autoclavar, ni sobrecalentar</li><li>➤ Ajuste de PH (25°C) = <math>7,4 \pm 0,2</math></li><li>➤ Temperatura de almacenamiento: <math>(5 \pm 3)</math> °C / en oscuridad y protegidos de la evaporación</li><li>➤ Tiempo de almacenamiento: mínimo 1 mes</li></ul>	

### A.8 Agar Plate Count (PCA)

Digestivo enzimático de caseína	5,0 g
Extracto de levadura	2,5 g
Glucosa, anhidra ( $C_6H_{12}O_6$ )	1,0 g
Agar	9 g a 18 g
Agua de grado reactivo	1000 ml
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Tipo de esterilización: Autoclave a 121°C por 15 min</li><li>➤ Ajuste de PH (25°C) = <math>7,0 \pm 0,2</math></li><li>➤ Temperatura de almacenamiento: <math>(5 \pm 3)</math> °C / en oscuridad</li><li>➤ Tiempo de almacenamiento: no exceder los 3 meses</li></ul>	

### A.9 Agar CN

Peptona de gelatina	16,0 g
Hidrolizado de caseína	10,0 g
Sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ )	10,0 g
Cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ )	1,4 g
Glicerol	10 ml
Agar	11,0 a 18,0 g
Agua de grado	1000 ml
<b>CN SUPLEMENTO</b>	
Bromuro de hexadeciltrimetil amonio (CETRIMIDE)	0,2 g
Ácido nadilixico	0,015 g
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Tipo de esterilización: Autoclave (<math>121 \pm 3</math>) °C por 15 min</li><li>➤ Enfriar el medio de 45 a 50°C, agregar el Suplemento</li><li>➤ Ajuste de PH (25°C) = <math>7,1 \pm 0,2</math></li><li>➤ Temperatura de almacenamiento: (<math>5 \pm 3</math>) °C / en oscuridad y protegidos de la evaporación</li><li>➤ Tiempo de almacenamiento: Dentro de 1 mes</li></ul>	

### A.10 Agar Nutritivo

Extracto de carne	1,0 g
Extracto de levadura	2,0 g
Peptona	5,0 g
Cloruro de sodio ( $NaCl$ )	5,0 g
Agar	15,0 g
Agua de grado reactivo	1000 ml
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Tipo de esterilización: Autoclave a 121°C por 15 min.</li><li>➤ Ajuste de PH (25°C) = <math>7,4 \pm 0,2</math></li><li>➤ Transferir aproximadamente 15 ml a placas</li><li>➤ Temperatura de almacenamiento: (<math>5 \pm 3</math>) °C / en oscuridad y protegidos de la evaporación</li><li>➤ Tiempo de almacenamiento: 1 mes</li></ul>	



### A.11 Caldo Acetamide

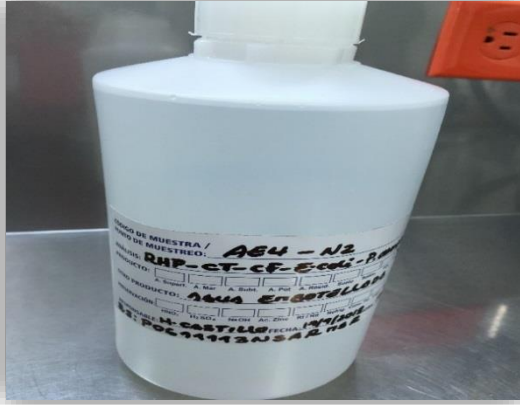
<b>Solución A</b>	
Fosfato di hidrogenado de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,0 g
Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ )	0,2 g
Acetamide	2,0 g
Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ )	0,2 g
Agua de grado reactivo	900 ml
<b>Solución B</b>	
Molibdato de sodio ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0,5 g
Sulfato de hierro hepta hidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0,05
Agua de grado	100 ml
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Añada 1 ml de solución B a Solución A</li> <li>➤ Dispense 5 ml de la solución final a tubos</li> <li>➤ Tipo de esterilización: Autoclave <math>121^\circ\text{C}</math> por 15 min</li> <li>➤ Ajuste de PH (<math>25^\circ\text{C}</math>) = <math>7,0 \pm 0,5</math></li> <li>➤ Temperatura de almacenamiento: <math>(5 \pm 3)^\circ\text{C}</math> / en oscuridad y protegidos de la evaporación</li> <li>➤ Tiempo de almacenamiento: Dentro de 3 meses</li> </ul>	

### A.12 Medio King's B

Peptona	20,0 g
Glicerol	10 ml
Fosfato hidrogenado de di-potasio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	1,5 g
Sulfato de magnesio Hepta hidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	1,5 g
Agar	15,0 g
Agua de grado reactivo	1000 ml
<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Tipo de esterilización: Autoclave <math>(121 \pm 3)^\circ\text{C}</math> por 15 min</li> <li>➤ Ajuste de PH (<math>25^\circ\text{C}</math>) = <math>7,2 \pm 0,2</math></li> <li>➤ Dispense volúmenes de 5 ml en tubos, permitir que solidifiquen inclinados</li> <li>➤ Temperatura de almacenamiento: <math>(5 \pm 3)^\circ\text{C}</math> / en oscuridad</li> <li>➤ Tiempo de almacenamiento: Dentro de 3 meses</li> </ul>	

## EVIDENCIAS

a) Muestreo y registro de datos.



Toma de muestra



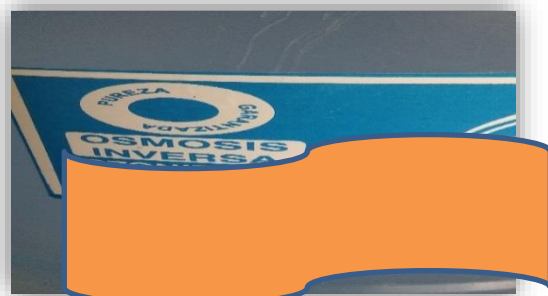
Unidades de muestra (N=5)



Bidón de 20 L



Bidón de 20 L (sin fecha de producción)



Tratamiento aplicado

b) Preparación de dilución y análisis de las muestras por membrana filtrante



Gravimetría (99ml de agua peptonada)



Rampa de filtración



bomba de vacío: presión Kpa



Uso de probeta clase A



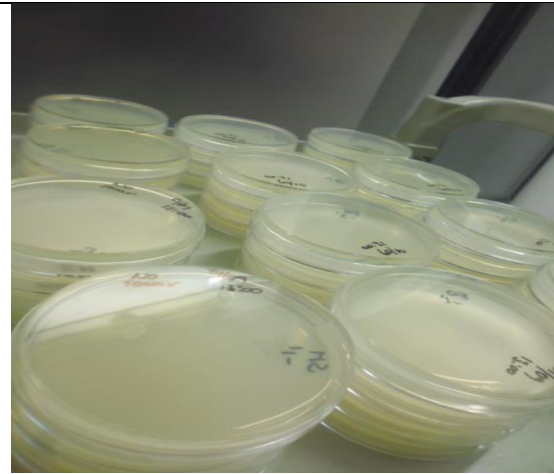
Transferencia de membrana



Uso de material estéril



c) Equipos empleados en análisis-incubación



Placas invertidas de agar Plate count



Incubadora para Heterótrofos



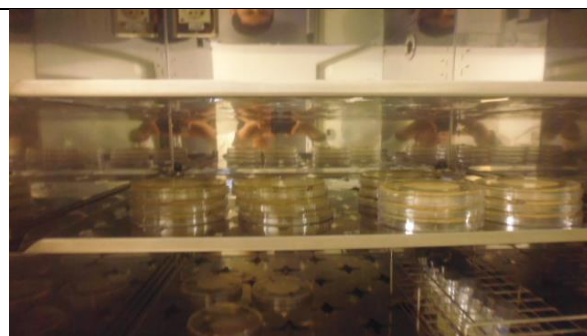
T° de trabajo: 35°C±0.5 (Heterótrofos)



RHP: No apilar más de 4 placas.



Incubadora con T° de trabajo: 36°±2°C



d) Equipos de lectura



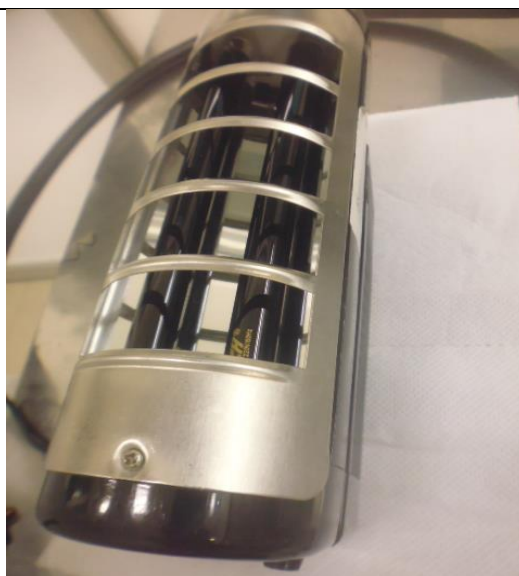
Contador de colonias-Boeco



Cámara de lectura para fluorescencia

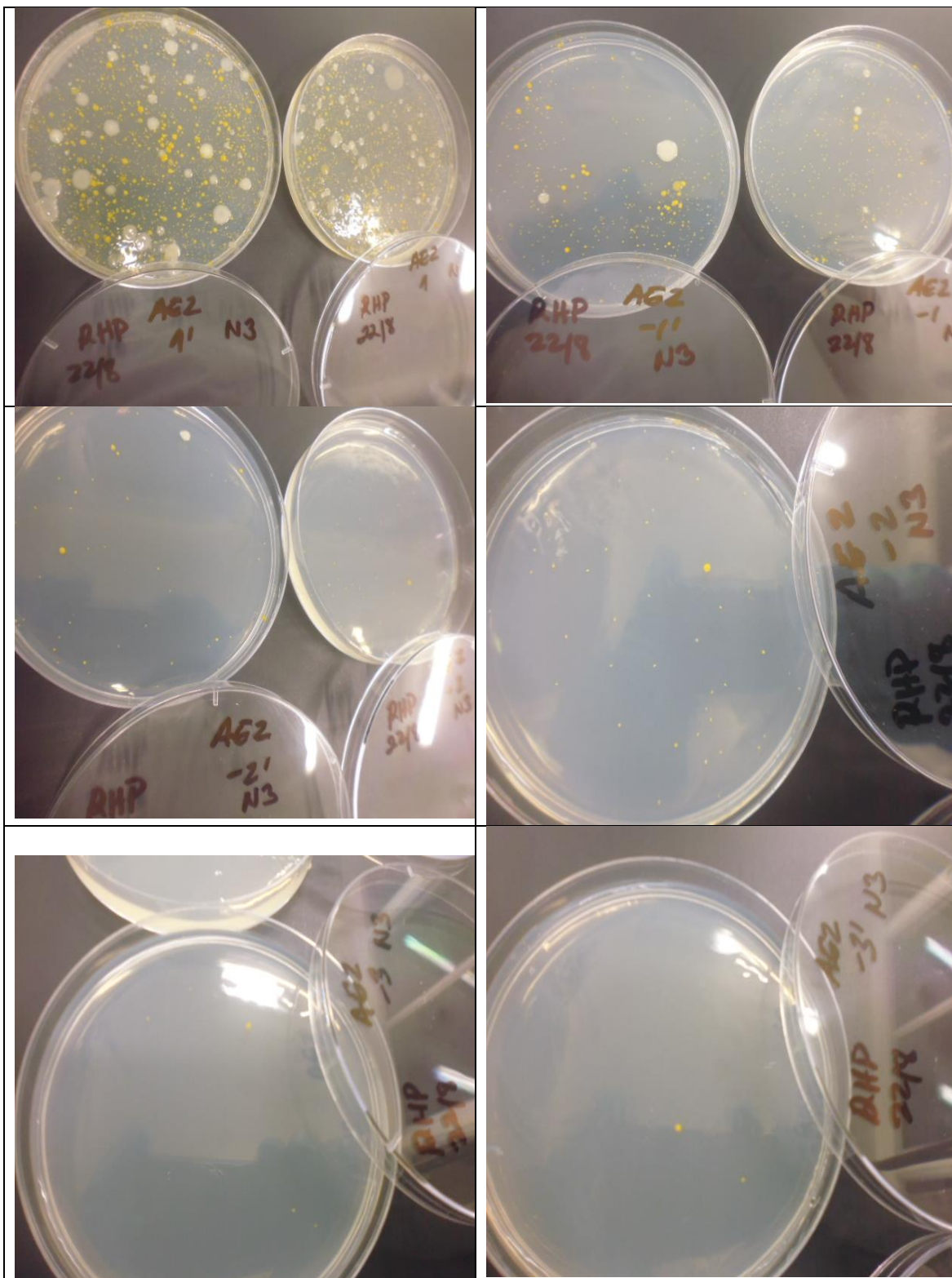


Lámpara de luz UV



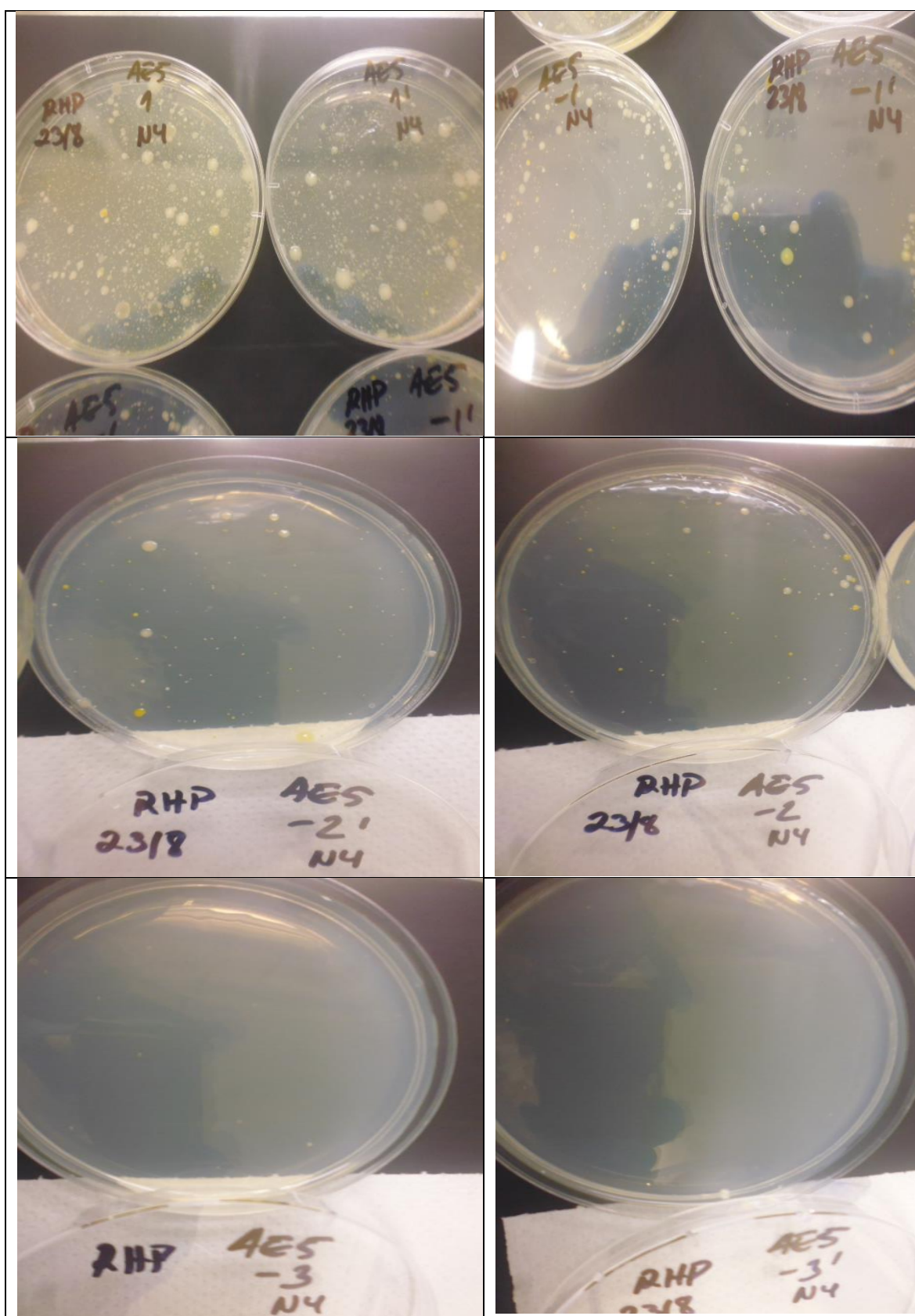
Longitud de onda: 365 nm.

e) Crecimiento de Heterótrofos en agar Plate Count

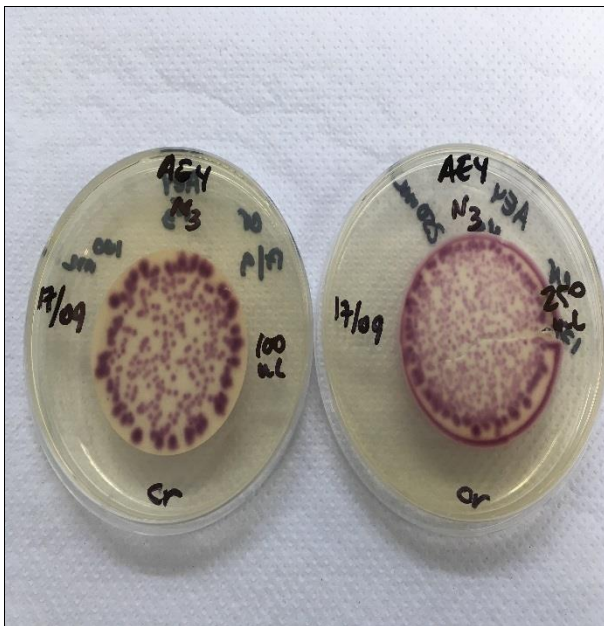




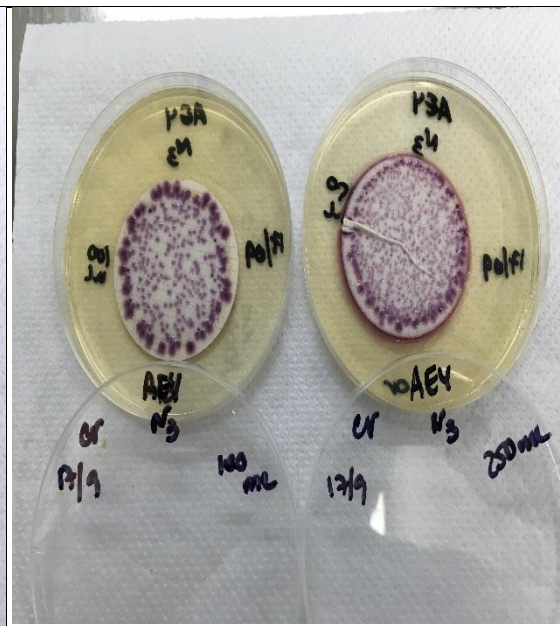
f) Recuento de Heterótrofos que exceden valores de NTS 071



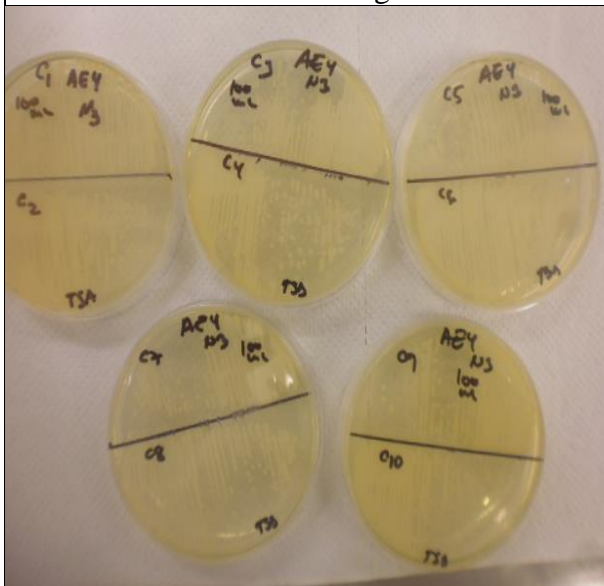
g) Crecimiento de bacterias coliformes y fase de confirmación



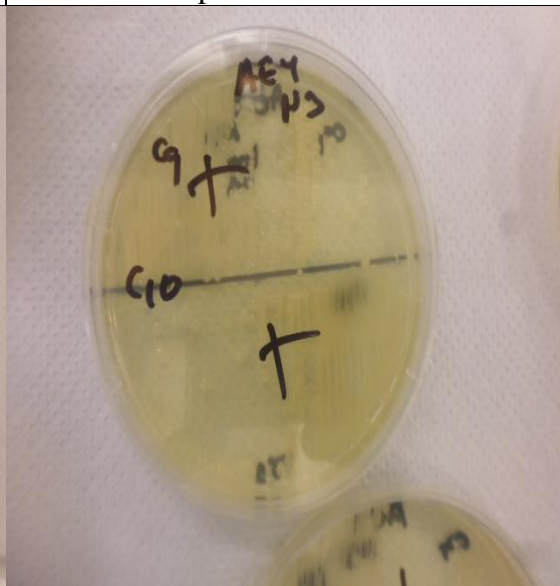
bacterias coliformes en agar chromocult



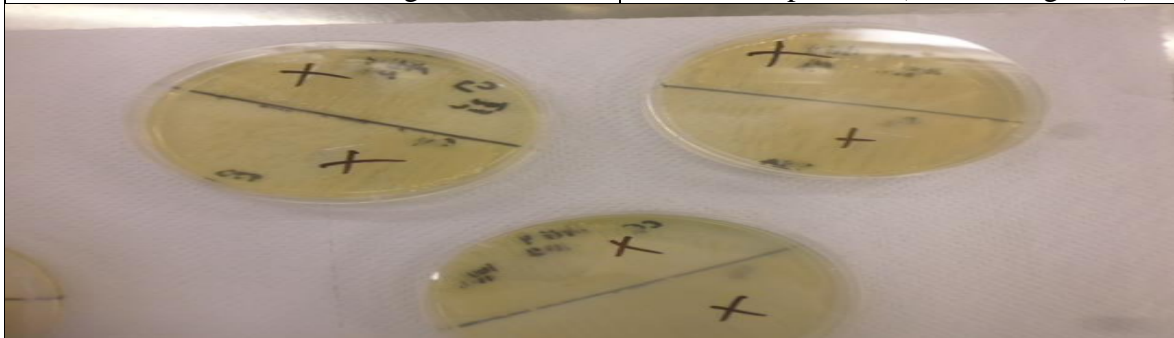
coliformes superaron límite de 100 UFC



Prueba de oxidasa en agar TSA



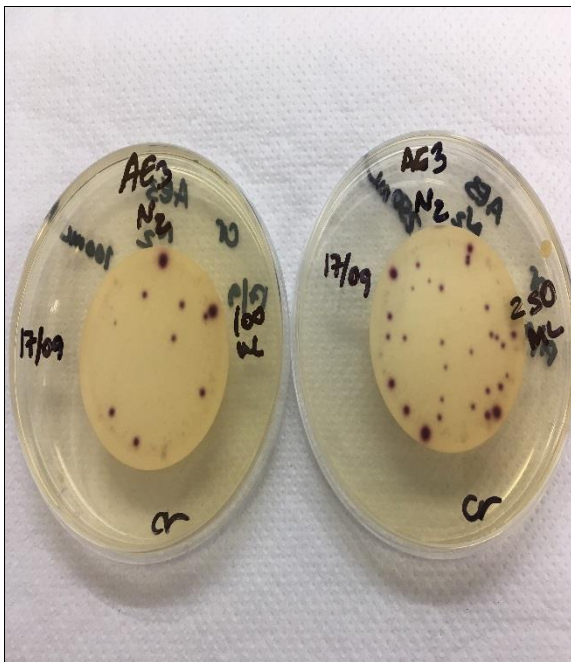
Reacción positiva (oxidasa negativo)



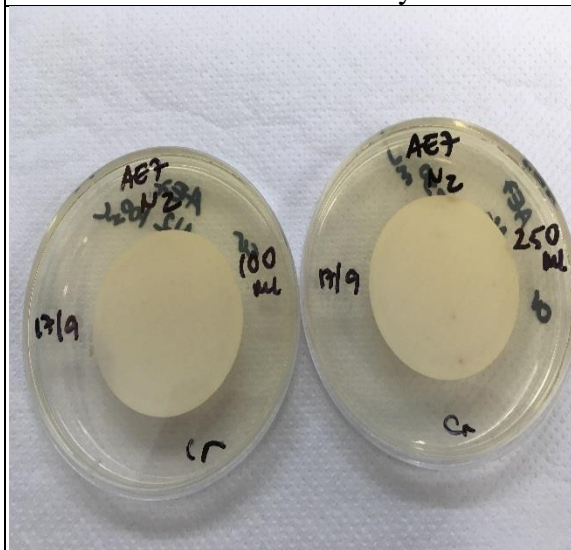
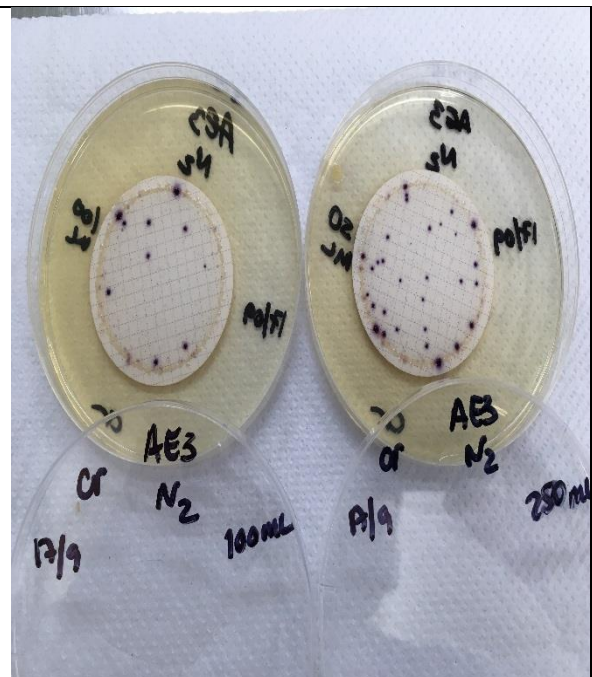
Oxidasa negativo – Típico en bacterias coliformes



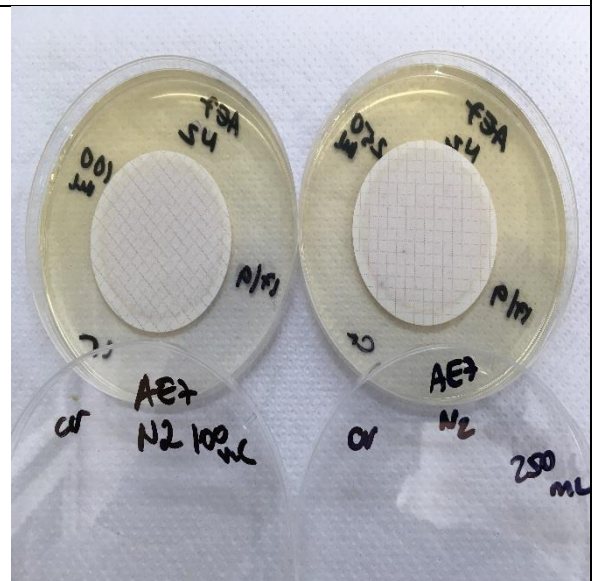
h) Colonias características de coliformes en agar Chromocult (cr)



Volumen filtrado de 100 y 250 ml

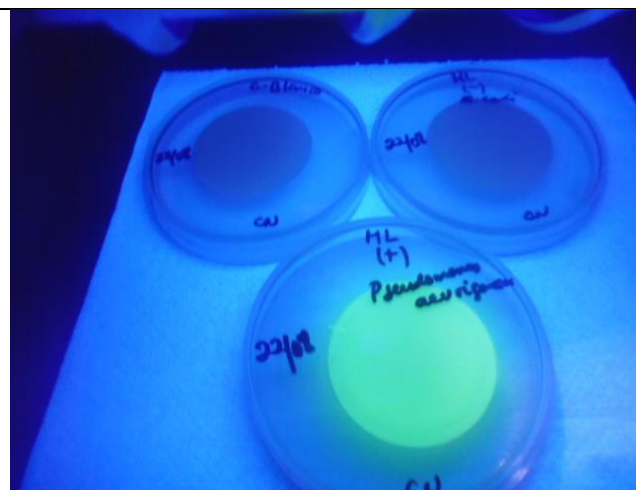


Ausencia de coliformes en agar cr

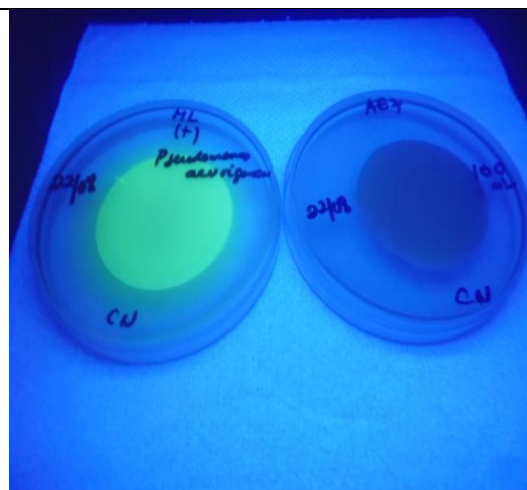


Prueba con reactivo fresco de oxidasa (no cambió a color púrpura dentro de 30 seg).

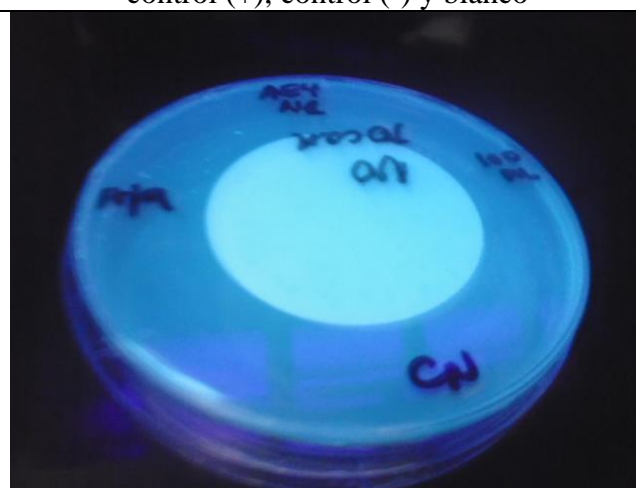
i) Detección de *P. aeruginosa* bajo lámpara de luz UV.



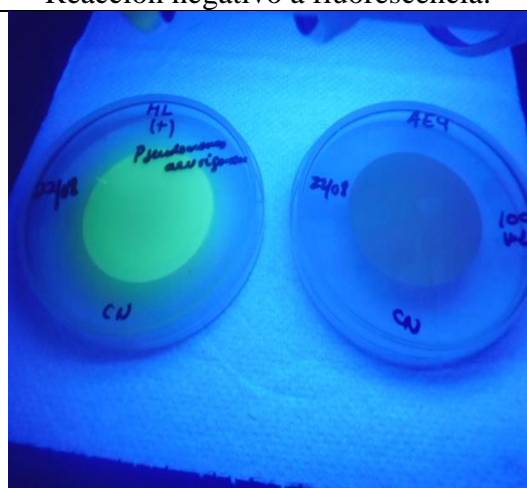
control (+), control (-) y blanco



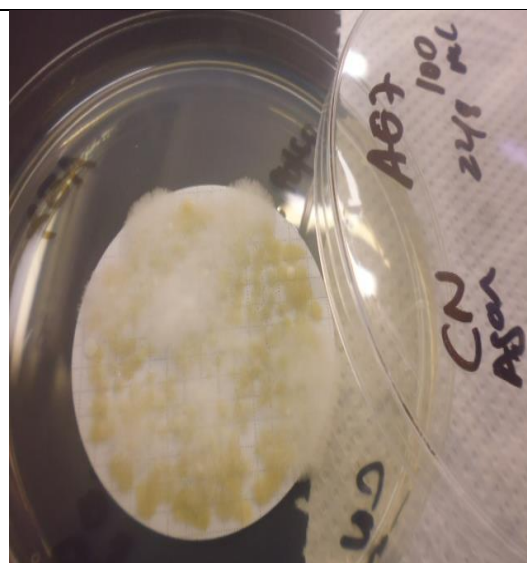
Reacción negativo a fluorescencia.



Detección de fluorescencia de pigmento



Muestra positiva con control positivo.



Ausencia de *P. aeruginosa* con crecimiento de Hongos



j) Inspección de planta productora de agua embotellada



P1: Salida de tanque



P2: Salida de sistema de filtrado



P3: Salida de ósmosis inversa

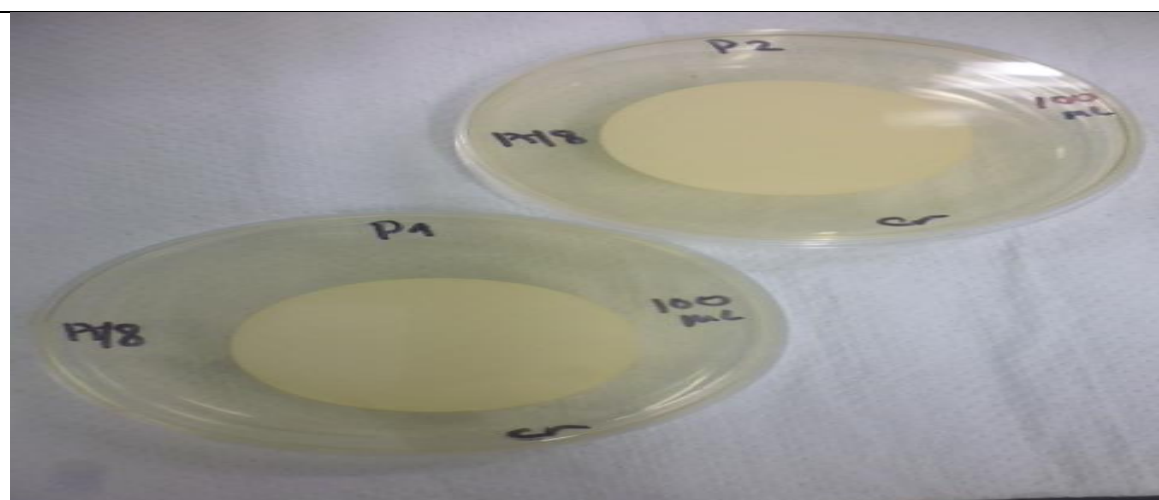


P4: Llenadores

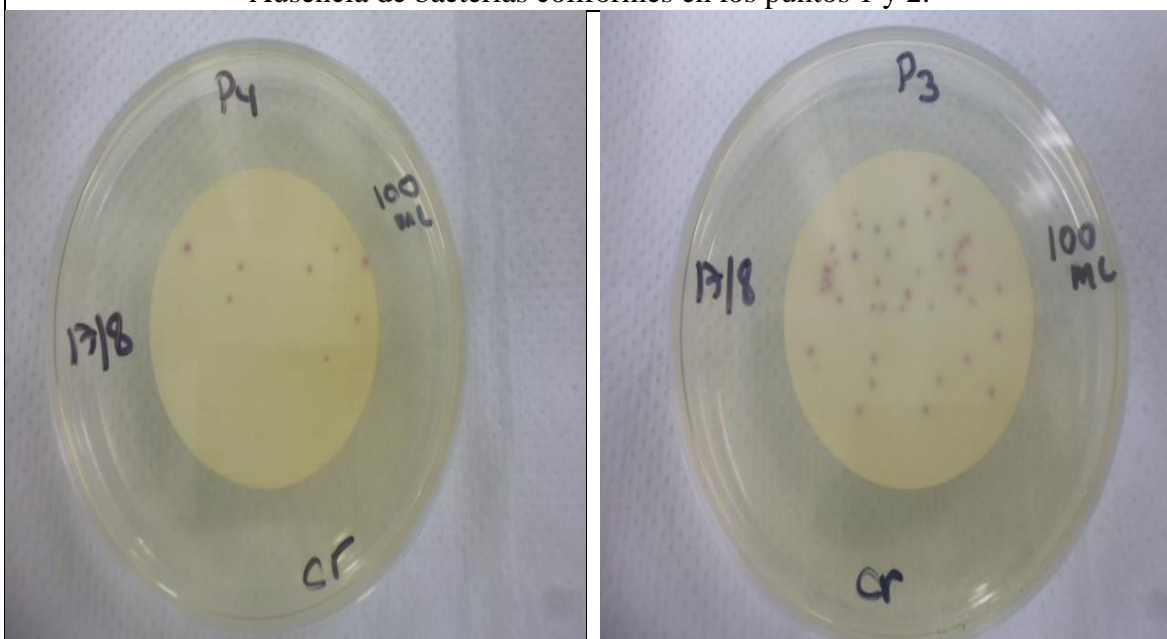


Sistema de purificación en marca evaluada. Agosto – 2018

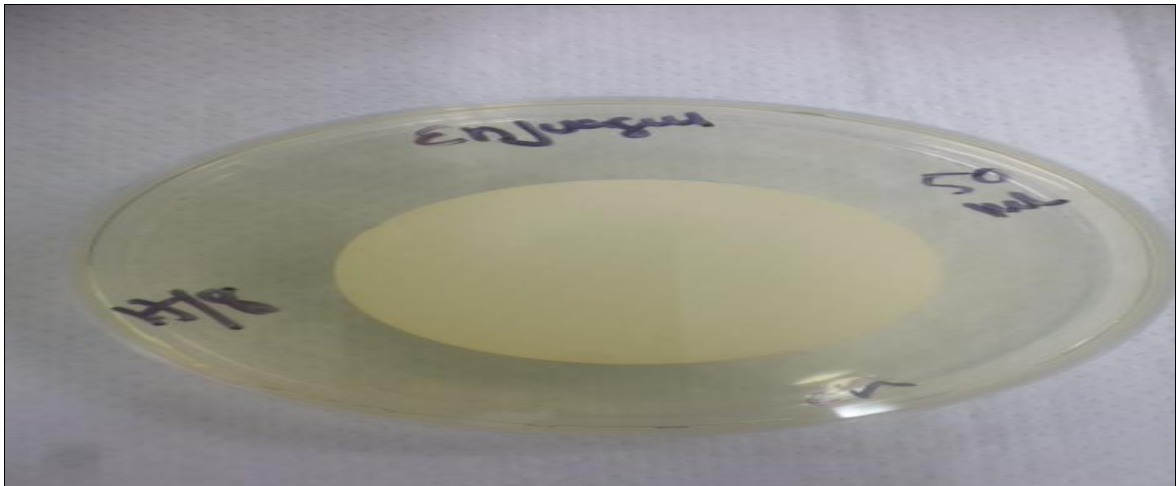
- k) Resultados de bacterias coliformes en agar Chromocult de los puntos P-1 al P- 4 y enjuague de 4 bidones.



Ausencia de bacterias coliformes en los puntos 1 y 2.



Crecimiento de coliformes en punto 4 y 3.



Ausencia de coliformes en enjuague de 04 bidones de 20L

1) Recuento de Heterótrofos de sistema de filtrado (P:2) y ósmosis inversa (P:3)



Valores elevados de Heterótrofos.